



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Caracterización química y actividad antineoplásica de principios
activos de *Rhus trilobata* en un modelo murino de
cáncer de ovario.”**

T E S I S

Que presenta:

M. en C. LUIS VARELA RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directoras de tesis:

**D.C. PATRICIA TALAMÁS ROHANA
D.C. BLANCA ESTELA SÁNCHEZ RAMÍREZ**

RECONOCIMIENTO.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio 9 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y en el laboratorio de Biotecnología III de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) con la dirección de la D.C. Patricia Talamás Rohana y la D.C. Blanca Estela Sánchez Ramírez.

En colaboración con el Departamento de Química (DQ) del CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco, el Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) y el Servicio de Imagenología del Centro Médico de 3^{er} Nivel, Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMyM) “Arturo Montiel Rojas”, donde se recibió el asesoramiento del D.C. Carlos Martín Cerda García Rojas, el D.C. José Juan Ordaz Ortiz y el Médico Radiólogo Rodrigo Daniel Castellanos Mijangos respectivamente, a quienes se agradece su participación y aportaciones intelectuales al proyecto.

La subvención económica para la realización de este trabajo de tesis fue aportada por CONACYT al proyecto de investigación científica básica (Reg. 221136), “Estudio de moléculas y mecanismos relacionados con los procesos de invasividad por protozoarios parásitos (*Entamoeba* sp.) y células cancerosas (INCan017 e INCan019)” al cual se agradece el apoyo.

El sustentante (CVU: 371151) recibió una beca durante su estancia en el programa de posgrado del DIPM, aportada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en la convocatoria nacional 2013 segundo periodo (No. de beca 247356).



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

AGRADECIMIENTO.

En estos momentos que finaliza uno de muchos sueños, quiero agradecer a Dios por permitirme cumplir esta meta y colocar en mi camino a personas que me hicieron crecer profesionalmente y madurar en mi vida personal. De igual manera, agradezco a mi familia por apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida y brindarme su amor, a pesar de las distancias que nos separan.



A mis compañeros de laboratorio en FCQ y en el DIPM, por su apoyo y por cada momento que compartimos juntos durante la elaboración de esta tesis, gracias por brindarme su amistad. Los amigos son la familia que uno elige, son los hermanos que se hacen, no por casualidad sino por cariño de verdad.

A mis mentores que a lo largo de mi vida profesional me forjaron y me guiaron hasta este sueño que concluye, gracias por tomarse el tiempo de transmitirme sus conocimientos y de compartir sus experiencias, porque con ello guiaron mis pasos por el camino de la investigación.

Por último, un agradecimiento especial a la D.C. Blanca Sánchez Ramírez y a la D.C. Patricia Talamás Rohana, por brindarme la oportunidad de ser parte de sus grupos de investigación y enseñarme las verdaderas implicaciones de esta profesión, como la responsabilidad y el trabajo arduo; también por dedicarme tiempo para esclarecer dudas o realizar correcciones pertinentes y sobre todo por apoyarme a finalizar con este proyecto. Gracias sinceramente por todas las oportunidades brindadas, su dedicación y su tiempo no habrán resultado en vano.

“zambúllete en busca de sueños, pues de lo contrario una consigna puede derribarte, (los árboles son sus raíces y el viento es viento). Confía en tu corazón, aun si se incendian los mares (y vive por amor, aunque las estrellas retrocedan)” ...

■ **E.E. Cummings.**

A handwritten signature in black ink that reads "Luis Varela R".

M. en C. Luis Varela Rodriguez

DEDICATORIA.



*A mi familia y amigos,
porque los quiero y son lo más importante en mi vida.*

Con todo mi cariño.



ÍNDICE GENERAL.

CONTENIDO	PÁGINA
RECONOCIMIENTO	II
AGRADECIMIENTO.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 MEDICINA TRADICIONAL	3
2.1.1 Medicina tradicional a base de plantas	3
2.1.2 Agentes quimiopreventivos contra el cáncer	5
2.1.2.1 <i>Rhus trilobata</i> Nutt (RHTR)	5
2.1.2.1.1 Descripción morfológica	6
2.1.2.1.2 Distribución geográfica	8
2.1.2.1.3 Información etnobotánica	10
2.1.2.1.4 Composición fitoquímica	10
2.1.2.1.5 Propiedades farmacológicas	12
2.1.2.2 Efecto de los polifenoles sobre las rutas apoptóticas	15
2.2 CÁNCER DE OVARIO	17
2.2.1 Tumores epiteliales	18
2.2.2 Diagnóstico	19
2.2.3 Mecanismo de carcinogénesis	20
2.2.4. Tratamiento	21
3. JUSTIFICACIÓN	23

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	23
5. HIPÓTESIS.	23
6. OBJETIVOS.	24
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	26
8.1 MATERIALES.	26
8.2 METODOLOGÍA.	26
8.2.1 Recolección del material vegetal.	26
8.2.2 Preparación y fraccionamiento de los extractos de la planta.	27
8.2.3 Caracterización fitoquímica de RHTR.	28
8.2.3.1 Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (RP-UPLC-PDA-QTOF-MS).	28
8.2.3.2 Cromatografía de Gases (GC-FID-MS).	29
8.2.3.3 Aislamiento e identificación de compuestos químicos.	30
8.2.4 Propiedades <i>in silico</i> de los compuestos identificados.	30
8.2.5 Líneas celulares como modelos de estudio experimental <i>in vitro</i>	31
8.2.5.1 Línea celular SKOV-3.	31
8.2.5.2 Línea celular CHO-K1.	32
8.2.5.3 Línea celular BEAS-2B.	32
8.2.5.4 Mantenimiento de los cultivos celulares.	34
8.2.6 Efecto de RHTR sobre líneas celulares.	34
8.2.6.1 Ensayo cometa.	35
8.2.6.2 Evaluación de la morfología y muerte celular.	36
8.2.7 Ratones desnudos (<i>Mus musculus</i> , <i>Nu/Nu</i>) como modelo de estudio experimental <i>in vivo</i>	37
8.2.7.1 Cuidado y mantenimiento de los ratones <i>Nu/Nu</i>	37
8.2.8 Estudio del efecto antineoplásico de RHTR.	38
8.2.8.1 Estudios imagenológicos del efecto antineoplásico.	39
8.2.8.1.1 Tomografía axial computarizada (TAC).	40
8.2.8.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	40

8.2.8.1.3 Ultrasonografía (USG).....	40
8.2.8.2 Determinación de parámetros bioquímicos y hematológicos.....	41
8.2.8.3 Evaluación anatómica.....	41
8.2.8.4 Evaluación histopatológica.	42
8.2.8.4.1 Tinción con hematoxilina-eosina (HyE).	43
8.2.8.4.2 Morfología ultra-estructural de tumores SKOV-3.....	43
8.2.9 Evaluación del efecto citológico de principios activos de RHTR en SKOV-3..	44
8.2.9.1 Generación de ERO intracelular por H ₂ -DCF-DA.	44
8.2.9.2 Determinación de la muerte celular por AnV/IP.....	44
8.2.9.3 Efecto de los principios activos de RHTR en la red de microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto celular por inmunohistofluorescencia (IHF).	45
8.2.9.4 Análisis del ciclo celular por IP.	46
9. RESULTADOS.....	48
9.1 Recolección e identificación de RHTR.....	48
9.2 Análisis por <i>UPLC</i> y <i>GC</i>	48
9.3 Identificación de metil galato por RMN.....	54
9.4 Propiedades farmacológicas <i>in silico</i> de los principios activos en RHTR.....	54
9.5 Actividad biológica de RHTR en líneas celulares.....	58
9.6 Actividad biológica de principios activos de RHTR en líneas celulares.....	59
9.7 Actividad antineoplásica de RHTR en ratones xenotrasplantados con SKOV-3...63	
9.7.1 Estudios de Imagenología por TAC y USG.....	64
9.7.2 Análisis histopatológicos de las lesiones tumorales tratadas con EA y FA02.66	
9.7.3 Evaluación toxicológica durante los tratamientos con EA y FA02.	66
9.8 Actividad antineoplásica de los principios activos de RHTR en ratones xenotrasplantados con SKOV-3.....	70
9.8.1 Estudios de Imagenología por RMN y USG.....	72
9.8.2 Análisis histopatológicos de las lesiones tumorales tratadas con ácido gálico y miricetina.	72
9.8.3 Evaluación toxicológica durante los tratamientos con ácido gálico y miricetina.	74

9.9 Efecto citológico de ácido gálico y miricetina en SKOV-3.....	78
10. DISCUSIÓN.	81
11. CONCLUSIONES.	85
12. PERSPECTIVAS.....	86
13. BIBLIOGRAFÍA.	87
14. APÉNDICES.....	101
15. ANEXOS.	107

ÍNDICE DE TABLAS.

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Aplicaciones y usos tradicionales de RHTR.....	11
Tabla 2. Actividad biológica y principios activos de algunas especies del género <i>Rhus</i>	13
Tabla 3. Clasificación modificada de la OMS de los tumores de ovario.....	18
Tabla 4. Clasificaciones TNM y FIGO de los tumores ováricos.	20
Tabla 5. Esquema de tratamientos utilizado en el estudio de la actividad antineoplásica de RHTR.	39
Tabla 6. Compuestos fitoquímicos más abundantes en RHTR por <i>UPLC-MS^E</i>	53
Tabla 7. Compuestos fitoquímicos en RHTR por <i>GC-MS</i>	53
Tabla 8. Compuestos fitoquímicos en FA02 de RHTR por <i>UPLC-MS^E</i>	56
Tabla 9. Propiedades moleculares y farmacológicas <i>in silico</i> de los principios activos en RHTR.	57
Tabla 10. Cl_{50} de RHTR en las líneas celulares SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B.	61
Tabla 11. Cl_{50} de los principios activos en RHTR sobre SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B.	61
Tabla 12. Análisis morfométrico durante la evaluación toxicológica de EA y FA02 de RHTR.	69
Tabla 13. Estudios paraclínicos en la evaluación toxicológica de EA y FA02 de RHTR.	70
Tabla 14. Análisis morfométrico durante la evaluación toxicológica de ácido gálico y miricetina.	75
Tabla 15. Estudios paraclínicos durante la evaluación toxicológica de ácido gálico y miricetina.	77

ÍNDICE DE FIGURAS.

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Hábitos de crecimiento de RHTR.	7
Figura 2. Características morfológicas de órganos aéreos de RHTR.....	7
Figura 3. Distribución geográfica de RHTR en América.	9
Figura 4. Mecanismos de acción molecular de diferentes agentes quimiopreventivos dentro de la célula.	16
Figura 5. Estrategia experimental implementada para evaluar la actividad biológica de los principios activos en RHTR.....	25
Figura 6. Microfotografías de células SKOV-3 en cultivo.	33
Figura 7. Microfotografías de células CHO-K1 en cultivo..	33
Figura 8. Microfotografías de células BEAS-2B en cultivo.	33
Figura 9. Modelo de ratón inmunodeficiente <i>nude-mice</i> (<i>mus musculus</i> , <i>Nu/Nu</i>).....	38
Figura 10. Análisis de células apoptóticas por AnV/IP por citometría de flujo.	45
Figura 11. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.	47
Figura 12. Características de la zona de recolección de RHTR.	49
Figura 13. Características morfológicas de RHTR	49
Figura 14. TICs por <i>UPLC-MS^E</i> y <i>GC-MS</i> con el perfil fitoquímico de RHTR.....	51
Figura 15. Perfil cromatográfico de la composición fitoquímica de RHTR por <i>UPLC-PAD</i>	52
Figura 16. TIC por <i>UPLC-MS^E</i> con la composición fitoquímica de las fracciones del EA de RHTR.	52
Figura 17. Espectro del 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo ($C_8H_8O_5$) por RMN a 300 MHz.....	55
Figura 18. Actividad biológica del EA y la FA02 de RHTR en líneas celulares de cáncer y epiteliales.....	60
Figura 19. Actividad biológica de principios activos en RHTR sobre líneas celulares de cáncer y epiteliales.....	62

Figura 20. Actividad antineoplásica del EA y la FA02 de RHTR en lesiones tumorales de cáncer ovárico.	65
Figura 21. Correlación imagenológica de la actividad antineoplásica del EA y la FA02 de RHTR en lesiones tumorales de cáncer ovárico	65
Figura 22. Análisis histopatológico a las lesiones tumorales de cáncer ovárico tratadas con el EA y la FA02 de RHTR	67
Figura 23. Análisis histopatológico de los órganos extraídos durante la evaluación toxicológica de los tratamientos con EA y FA02 de RHTR.....	68
Figura 24. Actividad antineoplásica del ácido gálico y la miricetina en lesiones tumorales de cáncer ovárico	73
Figura 25. Correlación imagenológica de la actividad antineoplásica del ácido gálico y la miricetina en lesiones tumorales de cáncer ovárico	73
Figura 26. Análisis histopatológico a las lesiones tumorales de cáncer ovárico tratadas con ácido gálico y miricetina.....	74
Figura 27. Análisis histopatológico de los órganos extraídos durante la evaluación toxicológica de los tratamientos con ácido gálico y miricetina.....	76
Figura 28. Efecto biológico del ácido gálico y la miricetina en células SKOV-3 durante 24 h de tratamiento	79
Figura 29. Cambios morfológicos en el citoesqueleto celular de SKOV-3 durante los tratamientos con ácido gálico y la miricetina	80

LISTA DE ABREVIATURAS.

% PR	Porcentaje de peso relativo
ACE	Antígeno carcinoembrionario
ACS	Reactivo grado analítico
ADE	Ancho de distribución eritrocitaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	Absceso hepático amebiano
AK-1	Adenilato cinasa 1
AKT	Quinasas específicas de serina-treonina
ALT	Alanina transaminasa
AMES	Ensayo toxicológico para evaluar la mutagenicidad de un compuesto
AnV	Anexina-V
AP-1	Proteína activadora 1
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica 1
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
AST	Aspartato aminotransferasa
ATO	Azul de toluidina
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B
Bcl-XL	Proteína xL de linfoma de células B
β-PGG	1,2,3,4,6-pentakis-O-galoil- β -D-glucosa
BRCA	Cáncer de mama
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CA-125	Antígeno carcinogénico 125
CC	Cromatografía en columna
CD₃OD	Metanol tetradeuterado
CHCl₃	Cloroformo
CI₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
CI₂₅	Concentración inhibitoria al 25%
CMHG	Concentración media de hemoglobina globular

COX-2	Ciclooxigenasa-2
CV	Coeficiente de variación
CYP	Familia de citocromo P450
DART	<i>“Drug affinity responsive target stability”</i>
D.E.	Desviación estándar
DL₅₀	Dosis letal del 50%
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dubelco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVP	Distribución de volumen plaquetario
EA	Extracto acuoso
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EH	Extracto hexánico
EM	Extracto metanólico
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESI	Ionización en <i>electro spray</i>
ET	Equivalentes Trolox
EtOH	Etanol
FA01	Fracción acuosa 01; ácido acético al 1%
FA02	Fracción acuosa 02; acetato de etilo
FA03	Fracción acuosa 03; éter etílico
FID	Detector de ionización en flama
FIGO	Federación internacional de ginecología y obstetricia
GC	Cromatografía de gases
GPS	Sistema de posicionamiento global
Gp-P	Glicoproteína de membrana plasmática
GST	Glutación-S-transferasa.
GPX	Glutación peroxidasa
H₂-DCF-DA	Diacetato de 2',7'-dihidrodiclorofluoresceina
HBA	Aceptor de puentes de hidrógeno

HBD	Donador de puentes de hidrógeno
HCM	Hemoglobina globular media
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HyE	Hematoxilina y eosina
ID	Identificación
IE	Impacto electrónico
IP	Ioduro de propidio
IS	Índice de selectividad
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Quinasas C-Jun <i>N</i> -terminal
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MDDR	Máxima dosis diaria recomendada vía oral
MDR	Resistencia a múltiples drogas
MDRP	Bomba de resistencia a múltiples drogas
MeOH	Metanol
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MS	Espectrometría de masas
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5,-difeniltetrazol
NBT	Nitro azul de tetrazolio
NF-κB	Factor nuclear κ B
Nu	<i>Nude</i>
OMS	Organización mundial de la salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PAD	Detector en arreglo de fotodiodos
PCT	Plaquetocrito
PE-5	Metilfenil silicona al 5%
PEG	Polietilenglicol
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C

PSA	Área superficial polar
QTOF	Cuadrupolo en tiempo de vuelo
RECIST	Criterios de valoración de respuesta en tumores sólidos
REDOX	Reacciones reducción-oxidación
RHTR	<i>Rhus trilobata</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Fase reversa
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
STIR	Secuencia de supresión de la señal grasa
T1	Secuencia potenciada en tiempo de relajación longitudinal
T2	Secuencia potenciada en tiempo de relajación transversal
TAC	Tomografía axial computarizada
TIC	Cromatograma de iones totales
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Sistema de estadificación de tumores malignos
TR	Tiempo de retención
TROLOX	(±)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento
UH	Unidades Hounsfield
UV	Ultravioleta
VCM	Volumen corpuscular medio
VPM	Volumen plaquetario medio
WST-1	Sal de tetrazolio soluble en agua
ZUMAQUE	Arbusto de 3 m, con tallo leñoso, hojas alternas y dentadas, así como fruto redondo en forma de drupa

RESUMEN.

Introducción. La decocción de los tallos de *Rhus trilobata* (RHTR), se ha utilizado en el tratamiento alternativo de algunos tipos de cáncer y dolencias gastrointestinales, por indígenas de la Sierra Tarahumara en Chihuahua, México. Sin embargo, hasta el momento sus principios activos se desconocen, su efectividad en el cáncer ovárico y sus efectos a la salud durante su consumo.

Objetivo. Identificar los principios activos de RHTR y evaluar su actividad antineoplásica en ratones xenotrasplantados con la línea celular SKOV-3.

Metodología. Se realizó la extracción de compuestos mediante decocción de los tallos en agua destilada (Extracto acuoso, EA) y el fraccionamiento con cartuchos C₁₈, empleándose agua ácida al 1 % (FA01), acetato de etilo (FA02) y éter etílico (FA03) como disolventes. La evaluación de la actividad biológica se realizó mediante curvas de viabilidad con MTT, observación de la morfología celular con tinción rápida Hemacolor® y estudios de apoptosis por TUNEL en las líneas celulares SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B. Se determinó la composición fitoquímica del EA y la fracción activa por UPLC-MS^E. La actividad antineoplásica se realizó en ratones hembra *Nu/Nu*, los cuales fueron xenotrasplantados con células SKOV-3, vía subcutánea con 5 x 10⁶ células en 100 µL PBS 1X. Posteriormente se dividieron en dos grupos, el primero fue tratado i.p. con EA y fracción activa a 200 mg/kg/día y el segundo vía peritumoral, con los principios activos a 50 mg/kg durante 2 días alternos a la semana; en ambos casos por 28 días. El peso de los roedores y la evaluación de las lesiones tumorales se determinaron constantemente con una báscula y un calibrador Vernier, para determinar el volumen tumoral. Al terminar los tratamientos, se realizaron estudios de imagen por TAC, RMN y la obtención de muestras de suero por punción retro-orbital para la determinación de parámetros bioquímicos. Finalmente, se llevó a cabo la necropsia de los roedores, para la disección de los tumores y los órganos para realizar estudios histopatológicos.

Resultados. En ensayos con MTT, la CI₅₀ del EA y la FA02 en SKOV-3 fue de 50 y 38 µg/mL respectivamente, mientras para CHO-K1 y BEAS-2B fue de 600 y 800 µg/mL para ambos casos ($p \leq 0.05$, ANOVA), adicionalmente se encontraron cambios en la

morfología celular y la inducción de apoptosis, lo cual demuestra un efecto selectivo. Los análisis de los perfiles cromatográficos del EA y la FA02, revelaron una abundancia relativa de 1,2,3,4,6-pentakis-O-galoil- β -D-glucosa (β -PGG), ácido gálico, quercetina, fisetina, amentoflavona y miricetina, así como de algunas variantes glicosiladas, los cuales han sido reportados con actividad inhibitoria en diferentes tipos de cáncer. La evaluación de la actividad antineoplásica en roedores con cáncer ovárico, revelaron que EA y FA02 de RHTR presentan un efecto reductivo en el desarrollo de las lesiones tumorales del 37.6 % y 49 % respectivamente ($p \leq 0.05$, ANOVA), debido a un efecto de quiescencia celular. El ácido gálico y la miricetina, inhibieron las lesiones tumorales en un 48.3 % y 50 % respectivamente ($p \leq 0.05$, ANOVA), por la inducción de apoptosis. Las observaciones anatómicas e histológicas del hígado, corazón, pulmón, riñón y bazo, así como de los parámetros bioquímicos, no revelaron efectos toxicológicos adversos durante los tratamientos con EA, FA02 y miricetina. Sin embargo, el grupo tratado con ácido gálico presentó una insuficiencia hepática a causa de una inflamación crónica producida por la pérdida de parénquima hepático.

Conclusión. RHTR inhibió el desarrollo de las lesiones tumorales a través de un efecto citostático, el cual se observó en estudios de imagen e histopatológicos, sin encontrarse efectos toxicológicos adversos durante su administración y el cual se relaciona con la abundancia de los compuestos β -PGG, ácido gálico, quercetina, fisetina, amentoflavona y miricetina, así como de algunas variantes glicosiladas. Por tanto, RHTR podría ser utilizada en el tratamiento complementario del cáncer ovárico; sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborarlo.

ABSTRACT.

Introduction. The decoction of *Rhus trilobata* (RHTR) stems, has been used as an alternative treatment of some types of cancer and gastrointestinal ailments by indigenous people from the Sierra Tarahumara in Chihuahua, Mexico. However, until now its active principles, its effectiveness in ovarian cancer and its effects on health during consumption are unknown.

Objective. To identify the active principles of RHTR and to evaluate its antineoplastic activity in mice xenotransplanted with the SKOV-3 cell line.

Methodology. The extraction of compounds was carried out by decoction of stems with distilled water (EA) and fractionation with C₁₈ cartridges using 1 % acid water (FA01), ethyl acetate (FA02) and ethyl ether (FA03) as dissolvent. Evaluation of biological activity was done via MTT viability curves, observation of the Hemacolor® fast staining cell morphology and TUNEL apoptosis studies on SKOV-3, CHO-K1 and BEAS-2B cell lines. The phytochemical composition of the EA and the active fraction was determined by UPLC-MS^E. The antineoplastic activity was performed in *Nu/Nu* female mice, which were xenotransplanted subcutaneously with 5 x 10⁶ SKOV-3 cells in 100 µL 1X PBS. Subsequently animals were divided into two groups, the first group was treated intraperitoneally with EA and the active fraction at 200 mg/kg/day and the second group was treated peritumorally with active principles to 50 mg/kg for 2 alternate days a week; in both cases for 28 days. The weight of the rodents and the evaluation of the tumor lesions were determined constantly with a scale and a Vernier qualifier to determine the tumor volume. At the end of the treatments, imaging studies were performed by CAT, NMR and the collection of serum samples by retro-orbital puncture for the determination of biometric parameters. Finally, a necropsy of the rodents was carried out, for the dissection of the tumors and organs for further histopathological studies.

Results. In MTT assays, the IC₅₀ of AE and AF02 in SKOV-3 was 50 and 38 µg/mL respectively, whereas for CHO-K1 and BEAS-2B it was 600 and 800 µg/mL for both cases ($p \leq 0.05$, ANOVA), additionally changes were found in cell morphology and induction of apoptosis, which demonstrates a selective effect. Analyzes of the chromatographic

profiles of EA and FA02 revealed a relative abundance of 1,2,3,4,6-pentakis-O-gallioyl- β -D-glucose (β -PGG), gallic acid, quercetin, fisetin, amentoflavone and myricetin, as well as some glycosylated variants which have been reported with inhibitory activity in different types of cancer. Evaluation of the antineoplastic activity in rodents with ovarian cancer, reveals that the EA and FA02 of RHTR have an inhibitory effect on the development of tumor lesions of 37.6 % and 49 % respectively ($p \leq 0.05$, ANOVA), due to an effect of cellular quiescence. Gallic acid and myricetin inhibited tumor lesions by 48.3% and 50%, respectively ($p \leq 0.05$, ANOVA), due to the induction of cellular apoptosis. Anatomical and histological observations of the liver, heart, lung, kidney and spleen, as well as biometric parameters, revealed no adverse toxic effects during EA, FA02 and myricetin treatments. However, the group treated with gallic acid had liver failure due to chronic inflammation caused by loss of hepatic parenchyma.

Conclusion. RHTR, inhibited the development of tumor lesions through a cytostatic effect, which was observed in imaging and histopathological studies, without adverse toxic effects being encountered during its administration and which is related to the abundance of β -PGG, gallic acid, quercetin, fisetin, amentoflavone and myricetin compounds, as well as some glycosylated variants. Therefore, RHTR could be used as an alternative or complementary treatment of ovarian cancer; however, additional studies are required to corroborate this claim.

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer de ovario es el sexto tumor más frecuente en la mujer y en México, ocupa la cuarta causa de defunciones por tumores ginecológicos [Gallardo-Rincón y cols., 2006]. El cáncer epitelial de ovario representa el 90 % de todos los casos de cáncer ovárico y entre ellos, el 80 % corresponde al tipo histológico seroso [Novoa-Vargas, 2014]. En México, las tres entidades federativas con mayor número de casos de cáncer ovárico son Nuevo León, el Estado de México y la Ciudad de México, debido a múltiples causas genéticas y epigenéticas [Rivas-Corchado y cols., 2011]. El principal tratamiento para esta enfermedad es la resección quirúrgica, seguida de un tratamiento complementario con quimioterapia [Botello y cols., 2006]; en la que se administran fármacos citotóxicos y/o citostáticos con actividad antitumoral [Gallardo-Rincón y cols., 2006], los cuales con el tiempo pueden ocasionar toxicidad en el organismo y generar resistencia en el tejido neoplásico [Martínez-Tlahuel y cols., 2006]. Es por ello, que se hace necesaria la búsqueda de nuevos candidatos terapéuticos para este padecimiento. Con este fin, se han examinado y utilizado productos naturales en el tratamiento del cáncer [Sang-Bong y Hae-Ryong, 2010], como el paclitaxel obtenido de la planta *Taxus brevifolia* [Centelles y Imperial, 2010], la vincristina de *Catharanthus roseus* [Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010] y la curcumina de *Curcuma longa* [Bar-sela y cols., 2010], los cuales muestran distintos mecanismos de acción contra las células cancerígenas.

En el Estado de Chihuahua, la decocción de los tallos de la planta regional RHTR se ha utilizado como tratamiento alternativo para algunos tipos de cáncer y dolencias gastrointestinales. Es conocida por sus habitantes, con el nombre común de “aciditos” o “agritos” debido al sabor característico de su fruto. RHTR pertenece a la familia de las anacardiáceas y su morfología es leñosa, de crecimiento difuso y con una altura de 1.5 m; además presenta hojas pequeñas, trifoliadas, pinnaticompuestas, de bordes aserrados y evidentemente hendidas, con un fruto esférico, carnoso y rojizo [Warnock-Turner, 2009].

En estudios previos, Abbott y cols. (1966) demostraron la actividad antineoplásica de los extractos elaborados por maceración con EtOH:CHCl₃ (1:1) de hojas y por decocción

en agua de los frutos de RHTR, al administrarse a 100 mg/kg y 400 mg/kg respectivamente, como dosis fija durante 7 días por vía i.p. a hámsters sirios xenotrasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de duodeno humano, con una inhibición en el peso de los tumores presentes del 33 % con respecto al control sin tratamiento para ambos casos. Mientras Pettit y cols. (1974), lograron aislar el ácido gálico y el etil galato del extracto etanólico al 50 % de hojas de RHTR por cromatografía en columna abierta y posteriormente, evaluaron sus actividades biológicas *in vitro* sobre la línea celular de adenocarcinoma nasofaríngeo humano KB, los cuales presentaron una CI_{50} de 3.1 y 18 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, por lo cual adjudicaron la actividad antineoplásica observada en el estudio *in vivo* a ambos compuestos. Además, Varela-Rodríguez y cols. (2013), realizaron un fraccionamiento del EA de tallos de RHTR en fase sólida, con disolventes de polaridad decreciente y encontraron actividad biológica *in vitro* en la fracción obtenida con acetato de etilo a 18 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon humano CACO-2; sin embargo, su composición química no reveló la presencia de ninguno de los compuestos mencionados anteriormente, por lo cual el principio activo de RHTR corresponde a un compuesto de naturaleza flavonoide, el cual no ha sido identificado.

Actualmente, el éxito limitado y los hallazgos de resistencia a la quimioterapia en el tratamiento del cáncer de ovario hacen necesaria la búsqueda de agentes terapéuticos alternativos para esta enfermedad. Las plantas utilizadas por la medicina alternativa representan una opción en la búsqueda de principios activos para el tratamiento del cáncer, por lo cual se hace importante la realización de investigaciones encaminadas a la identificación de los mismos. Trabajos recientes que fueron llevados a cabo con la planta RHTR, sugieren la posible presencia de agentes antineoplásicos que pudieran representar nuevos candidatos terapéuticos para el tratamiento del cáncer ovárico que aqueja a la población femenina en México y el mundo.

2. ANTECEDENTES.

2.1 MEDICINA TRADICIONAL.

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Se le define como el conjunto de conocimientos y prácticas usadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, confiando exclusivamente en la experiencia obtenida de la observación, la práctica o la transmitida de generación en generación, de forma oral o escrita [Bucay, 2009]. Por lo que es un término amplio utilizado para referirse a diferentes sistemas de tratamiento de enfermedades, como por ejemplo las diversas formas de medicina indígena, así como la medicina tradicional china, hindú y árabe que puede incluir terapias con medicación, que implica el uso de medicamentos obtenidos de hierbas, partes de animales y/o minerales, o terapias sin medicación, donde se recurre al uso de acupuntura, terapias manuales y espirituales. En los países donde el sistema sanitario dominante se basa en la medicina alopática, o donde la medicina tradicional no se ha incorporado en el sistema sanitario nacional, esta se clasifica a menudo como medicina “complementaria” o “alternativa”, también como “no convencional”. El uso de la medicina tradicional sigue estando muy extendido en los países en vías de desarrollo, mientras que el uso de la medicina complementaria y alternativa está aumentando rápidamente en los países desarrollados [Pérez, 2005]. En muchos lugares del mundo, los profesionales sanitarios y el público en general aún se mantienen en debate con preguntas sobre la seguridad, la eficacia, la calidad, la disponibilidad, la preservación y el desarrollo de este tipo de atención a la salud, ya que realmente la valoración de los productos de la medicina alternativa, como los elaborados a base de plantas, es especialmente difícil [Pérez, 2005]. Sin embargo, muchos de los remedios usados por la población han sido incluidos en la medicina alopática después de demostrar científicamente su eficacia [Lentini, 2000].

2.1.1 Medicina tradicional a base de plantas.

Gran parte de los tratamientos tradicionales suponen el uso de plantas o sus principios

activos preparados en forma artesanal o industrial como infusiones, extractos, jarabes, polvos, jugos, compresas o pomadas [Fretes, 2010 y González, 2004]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene compuestos químicos con capacidad terapéutica, o cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos con base en su estructura química como modelo para su elaboración [OMS, 2005]. Existen al menos tres razones que explican la importancia de la medicina tradicional basada en el uso de plantas: primera, éstas son mucho más económicas y accesibles; segunda, no existen registros que indiquen resistencia o tolerancia a los extractos totales de las plantas, posiblemente debido a la acción sinérgica de los diversos constituyentes y tercera, es posible (aunque no se asegura) que la fitoterapia produzca menos efectos adversos que la quimioterapia [Taborda, 2009]. El reconocimiento y la validación de los tratamientos empleados en la medicina popular (por su experiencia práctica, tradiciones y usos), permite emplear como materia prima plantas que pueden dar lugar a fitomedicamentos o utilizar sus principios como biomarcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos, por lo cual tiene una importante aplicación en la medicina moderna [Jigna y Sumitra, 2007].

Actualmente, el 35 % de los medicamentos que se distribuyen en todo el mundo son productos derivados directamente de plantas, con una tendencia notoria a crecer, ya que continuamente se elaboran nuevos medicamentos de las mismas [Piñeyro, 2009]. Para dar una idea de la importancia económica del aprovechamiento de estas plantas por la industria farmacéutica a nivel mundial, diremos que el valor de las medicinas extraídas de ellas en Estados Unidos (EE.UU.) se encuentra actualmente cercano a 3,000 millones de dólares al año; mientras que a partir de la década de los 80 en los países de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico asciende a unos 43,000 millones de dólares anuales [Palacio, 2000]. Por tanto, es importante que aquellas plantas que presentan mayor popularidad en la medicina tradicional por alguna de sus propiedades sean investigadas con el fin de determinar su eficacia y evaluar su potencial como fuente de nuevos principios activos con actividad terapéutica [Taborda, 2009; Lai y cols., 2010]. En México, los fitomedicamentos fueron reconocidos como medicamentos y

son regulados por la Ley General de Salud en el reglamento de insumos para la salud [Romero y Tortoriello, 2007].

2.1.2 Agentes quimiopreventivos contra el cáncer.

El término quimiopreventivo en oncología se refiere a la utilización de productos naturales o de compuestos activos aislados y purificados, para administrarse en forma de tratamiento y que sean capaces de inhibir, disminuir o revertir el proceso de carcinogénesis, además de que puedan ser aplicados en cualquier momento de su transcurso, inclusive en aquellos pacientes que han superado con éxito este padecimiento, pero que están en riesgo de sufrir una recaída [Kelloff y cols., 2000]. Por tanto, sirven principalmente como coadyuvantes al tratamiento que se aplica normalmente en la medicina alopática, ya que mejoran la eficacia terapéutica y muestran una menor toxicidad en el cuerpo [Viveros y cols., 2010]. Generalmente, estos compuestos recurren a la modulación del sistema REDOX en el organismo, activando el elemento de respuesta antioxidante (*ARE*) y se piensa, que podrían estar también activando diversos mecanismos moleculares con actividad antitumoral dentro de las células, por ejemplo regulando distintas vías de señalización involucradas en la supervivencia celular (*NF-κB*, *AKT* y *COX-2*) o en el camino apoptótico (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, caspasas, *p21^{WAF1}*, etc.) al sensibilizar a las células cancerosas [Viveros y cols., 2010]. Investigaciones recientes, sugieren que la combinación de ambas terapias para tratar el cáncer resulta más eficaz y específica, ya que se genera una acción sinérgica entre ambas y disminuye la toxicidad generada por la administración única del tratamiento convencional, al reducir la dosis y frecuencia con la que se aplican [Sarkar y Li, 2007]. Actualmente se han comenzado a emplear antioxidantes dietarios provenientes de las plantas con una alta concentración en polifenoles, como agentes quimiopreventivos al promover su consumo en forma de extractos, suplementos y alimentos nutraceuticos o funcionales con esta finalidad [Pszczola, 2003].

2.1.2.1 *Rhus trilobata* Nutt (RHTR).

En el estado de Chihuahua, la planta regional RHTR se utiliza con frecuencia como

un quimiopreventivo en forma de infusión, para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y dolencias gastrointestinales. Es un arbusto conocido por la población mexicana como “aciditos” o “agritos” debido al sabor característico de su fruto [Ecosistemas y Medio Ambiente Sierra Madre S.C., 2009]. En otros países como EE.UU. y Canadá se le denomina con el nombre común de *Skunkbush* [Casebeer, 2004]. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	<i>Plantae</i>
SUBREINO	<i>Tracheobionta</i>
DIVISIÓN/FILO	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
SUBCLASE	<i>Rosidae</i>
ORDEN	<i>Sapindales</i>
FAMILIA	<i>Anacardiaceae</i>
GÉNERO	<i>Rhus</i>
ESPECIE	<i>Rhus trilobata</i>

2.1.2.1.1 Descripción morfológica.

El agrito es un *Zumaque* de morfología irregular, ya que crece de forma vertical hasta alcanzar una altura de 0.6 a 2.1 m aproximadamente dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 1A y B), pero suele formar montículos difusos y densos en anchura que puede duplicar el tamaño de la planta en altura [Scianna, 2004; Shaw y DeBolt, 2004]. La raíz principal, junto con las raíces fibrosas secundarias se encuentran a una considerable profundidad y son el anclaje del arbusto, ya que la planta muere al crecer por encima del suelo de manera superficial [Casebeer, 2004; Shaw y DeBolt, 2004]. Cuando las ramas son jóvenes presentan una coloración marrón y suelen ser puberulentas, volviéndose grises con la edad [Shaw y DeBolt, 2004]. Las hojas emiten un olor fuerte al ser aplastadas y poseen un aroma que suele ser medicinal o amargo, (desagradable para algunos); son compuestas y alternas en las ramas, con tres subsésiles casi sin pecíolo, generalmente de forma oval o romboidal. El folíolo terminal es el más grande y tiene forma de abanico, con una longitud de 1 a 2 cm, mientras los dos inferiores son aproximadamente de la mitad del tamaño con una superficie crenado-lobulado. Los márgenes de las hojas son toscamente dentados, pero la mayoría de los

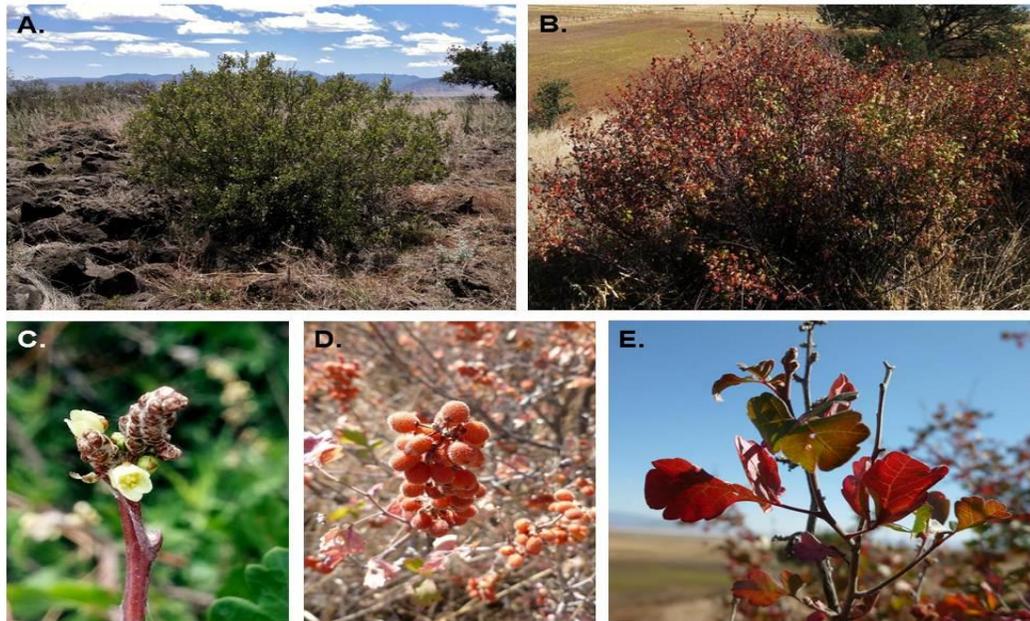


Figura 1. Hábitos de crecimiento de RHTR. En las fotografías se muestra: (A y B) ejemplares representativos de las poblaciones de RHTR presentes en el Cerro Pelón, Namiquipa, durante mayo y noviembre respectivamente; (C) flores discretas que aparecen en las puntas de las ramas durante julio; (D) frutos en forma de racimos que suelen aparecer en las ramas durante agosto de un sabor agrio/amargo característico; (E) hojas trifoliadas que adquieren una coloración rojo-naranja a comienzos de la estación de otoño. (Fotografías por Varela-Rodríguez).

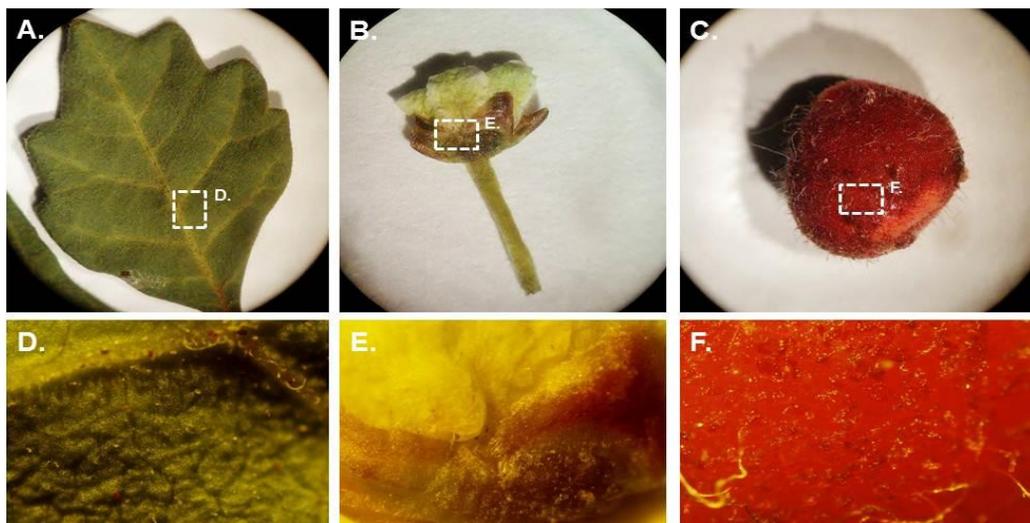


Figura 2. Características morfológicas de órganos aéreos de RHTR. Imágenes tomadas con un estereoscopio a 2X de aumento de: (A) hojas trifoliadas, pinnaticompuestas, de bordes aserrados y evidentemente hendidas; (B) flores discretas de color perlado, con cinco pétalos y 10 estambres colocados en forma centrípeta con un óvulo por carpelo; (C) frutos pequeños, esféricos, carnosos de tono rojizo; (D-

F) ampliaciones de las zonas señaladas en la imagen por microscopia con un aumento de 4X, donde puede observarse: (D) cara adaxial de las hojas con las yemas axilares cubiertas de tricomas simples; (E) eje floral y sépalos cubiertos de resina; (F) epicarpio irregular del fruto cubierto de algunas microvellosidades y resina. (Fotografías por Varela-Rodríguez).

dientes se redondean con el tiempo, presenta pubescencia variable que se vuelve más suave conforme el follaje madura, siendo más brillantes al estar maduras y llega a medir de 3 a 7 cm de largo (Figura 2A). Durante el verano suelen ser de un color verde oscuro, que en otoño se vuelve amarillo o naranja y después rojo a un púrpura rojizo (Figura 1E) [Andrés y cols., 2006; Shaw y DeBolt, 2004; Rose, 2005; Casebeer, 2004]. Durante la primavera (usualmente marzo o abril) RHTR presenta flores que se desarrollan antes de que aparezca su follaje. Las inflorescencias consisten en grupos de picos situados cerca de las puntas de las ramas, en racimos de pequeñas flores con más de 10 estambres colocados en forma centripeta y a veces contienen más de un óvulo por carpelo (Figura 1C) [Shaw y DeBolt, 2004]. Las flores son discretas, de color amarillo pálido (perlado) e imperfecto, en su mayoría con cinco pétalos (Figura 2) [Andrés y cols., 2006; Rose, 2005]. Los frutos de la planta maduran de junio a septiembre, permaneciendo en el arbusto hasta bien entrado el invierno (Figura 1D). Son rígidos, carnosos, sub globosos, de color rojo-naranja, con un tamaño de 6 a 8 mm de diámetro, suelen ser un poco peludas y pegajosas en la superficie (Figura 2C), con un sabor agrio/amargo que recuerda al limón cuando están frescas, lo suficiente para que algunos le hayan adjudicado a la planta el nombre de “aciditos” [Warnock, 2009]. La acidez de los frutos proviene de los ácidos gálico y tánico principalmente [Márquez y cols., 2001] (Figura 1D).

2.1.2.1.2 Distribución geográfica.

La RHTR presenta una distribución geográfica amplia y variable a lo largo de la región neártica de América, encontrándose frecuentemente en el occidente de Canadá (Figura 3B); al oeste-centro de los EE.UU. en las grandes planicies, hasta el sur de California y Texas (Figura 3C) [Scianna, 2004]; lográndose extender hasta México en las zonas serranas principalmente (omitiendo las costas húmedas del noroeste del Pacífico) (Figura 3A) [Rzedowski y Calderón-Rzedowski, 1999]. Puede crecer en diversas zonas

ecológicas tales como desiertos, praderas, llanuras con matorrales de montaña y chaparrales, así como en zonas con arbustos, gramíneas y distintas plantas herbáceas, a pleno sol o sombra parcial a una altura de 1,050 a 2,400 m.s.n.m. (región intermontaña), en sitios que reciben 250 a 500 mm de precipitación pluvial (de 10 a 20 pulgadas en promedio) u otros lugares que reciben humedad adicional [Shaw y DeBolt, 2004]. También se encuentra adaptada a una amplia variedad de condiciones en el suelo, creciendo en medios ligeramente básicos y tolerando aquellos neutros-ácidos; con texturas que son desde arcillosas hasta arenosas [Medina-Lemos y Fonseca, 2009]. Aunque en México no existe un estudio detallado de la distribución geográfica de RHTR, se cuenta con evidencia de que ocupa gran parte de las regiones orientales del Estado de Chihuahua, como zonas desérticas o semidesérticas de clima seco hasta las altas llanuras donde comienza la Sierra Tarahumara, a una altitud de 1,500 m.s.n.m. aproximadamente [Estrada-Castillón y Villarreal-Quintanilla, 2010]. Se tienen registros de algunos especímenes de RHTR en el herbario de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, los cuales fueron colectados en la localidad de

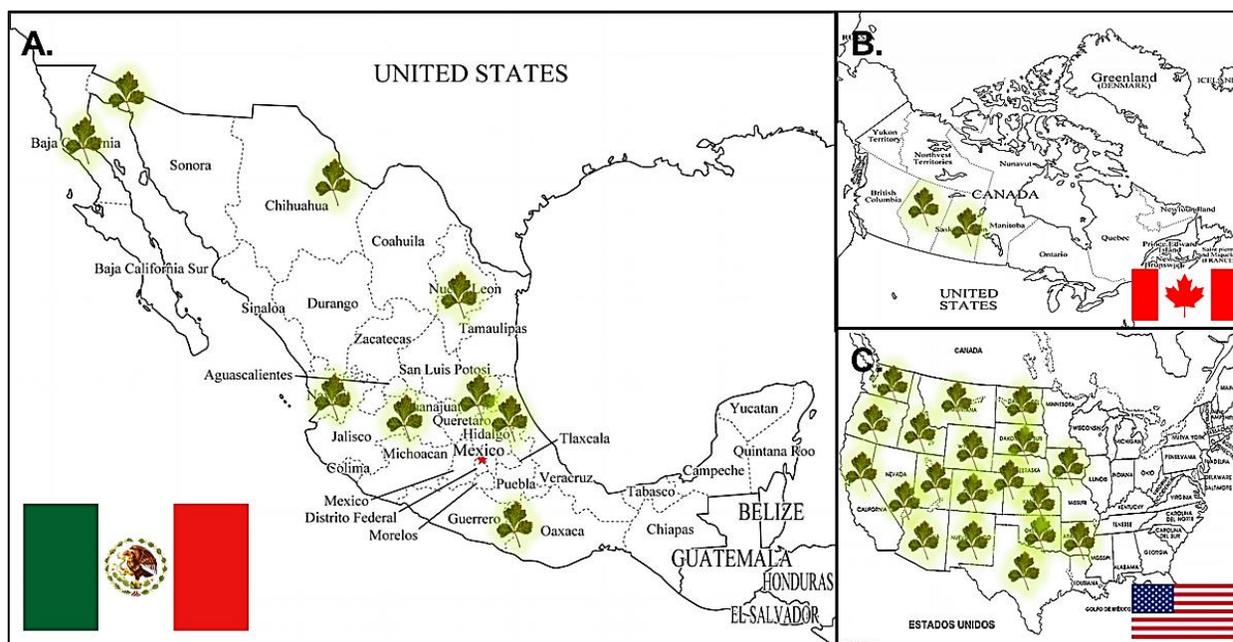


Figura 3. Distribución geográfica de RHTR en América. (A) México; (B) Canadá; (C) EE.UU. FUENTE: Modificado de *Natural Resources Conservation Service, USDA, EE.UU.* y Andrés-Hernández y cols., 2006.

Santa Ana (anteriormente llamada Oscar Soto Máynez) en el Municipio de Namiquipa, el cual cuenta con un suelo somero y pedregoso con zacates amacollados y encinos, finalmente en la localidad de Nicolás Bravo y Las Varas en el Municipio de Madera, con bosques de pino, táscate y encino a una altitud de 2,150 m.s.n.m. [Ecosistemas y Medio Ambiente Sierra Madre S.C., 2009].

2.1.2.1.3 Información etnobotánica.

El arbusto RHTR históricamente ha sido empleado principalmente con fines medicinales. En Chihuahua, se ha utilizado de manera tradicional en forma de infusión para el tratamiento de algunos tipos de cáncer como leucemias y de origen gastrointestinal (Tabla 1). La infusión ha sido preparada a partir de los tallos de la planta por las poblaciones indígenas en las regiones serranas del estado durante generaciones; la corteza se ha utilizado para preparar una bebida que logra aliviar los síntomas del resfriado; los frutos amargos se han consumido para calmar las molestias gastrointestinales y el dolor de muelas al prepararse caliente como una bebida similar a la limonada, o para hornearse en la preparación de pan y tartas [Márquez y cols., 2001]; también las hojas y las raíces se han hervido y consumido para aliviar diversos malestares. Inclusive las hojas se han empleado para fumar. Las ramas flexibles han sido útiles para la elaboración de cestas y alfombras. Actualmente el arbusto se emplea para el control de la erosión y el paisajismo, ya que es una planta útil para la recuperación de tierras baldías que han sido despojadas por la minería [Shaw y DeBolt, 2004], e históricamente los miembros del género *Rhus* se han utilizado en la industria de la curtición de pieles debido a la concentración elevada de taninos que presentan [Zalacain-Aramburu, 2001], por lo cual RHTR podría representar un producto de gran valor en dicha industria.

2.1.2.1.4 Composición fitoquímica.

Actualmente, no existe un estudio completo que describa la composición química de RHTR. Pettit y cols. (1974) al buscar nuevos agentes antineoplásicos, lograron aislar, del extracto de hojas de RHTR con EtOH al 50 %, el ácido gálico y el etil galato; compuestos

Tabla 1. Aplicaciones y usos tradicionales de RHTR.

Información etnobotánica de RHTR	
Nombre común.	Aciditos, Agritos, Agrios.
Forma de consumo.	Oral.
Parte utilizada.	Raíces (ocasionalmente) y tallos.
Tiempo de colecta.	Todo el año (principalmente abril).
Preparación medicinal.	Hervir en agua los tallos por 30 min.
Dosis medicinal.	Ingerir la infusión en lugar de agua todo el día.
Usos.	Para dolencias gastrointestinales y el cáncer.

FUENTE: Varela-Rodríguez, 2013.

que han sido encontrados en otras especies del mismo género, como *R. coriaria* y *R. trichocarpa* entre otras plantas [El Sissi y cols., 1971; Yasue y Kato, 1957]; en las cuales se ha observado que dichos compuestos presentan actividad antineoplásica, antimicrobiana, antiviral y antioxidante, principalmente [Rayne y Mazza, 2007; Mohan y cols., 2014; Yang y cols., 2014]. Otros estudios realizados en EE.UU., demostraron la presencia de ácido gálico y ácido tánico en los frutos, a los cuales se atribuyeron las propiedades antineoplásicas, antiparasitarias y antioxidantes de los mismos [Márquez y cols., 2001]. Varela-Rodríguez (2013), realizó un tamizaje fitoquímico preliminar en extractos de tallos de RHTR con MeOH al 70 % y hexano, para identificar de manera cualitativa diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes, encontrando taninos, flavonoides, antocianinas, cumarinas, ácido gálico, principios amargos, triterpenos y saponinas. Sin embargo, no encontró glucósidos cianogénicos y no pudo determinar la presencia de alcaloides. Por medio de reacciones REDOX se detectaron aminofenoles, catequina y pirogalol, logrando confirmar por *HPLC* únicamente la presencia del ácido gálico, flavonoles y antocianinas. Se ha observado que dichos compuestos tienen una amplia serie de actividades sobre las células, sin embargo el mecanismo de acción de todos los metabolitos secundarios no se conoce con exactitud. Diversos estudios muestran que los terpenoides pueden tener actividad antimicrobiana al dañar la membrana celular y que las saponinas pueden desintegrar las membranas de las células al formar complejos con los esteroides endógenos [Montes-Belmont, 2009]. Así mismo, los compuestos fenólicos pueden inhibir las enzimas celulares al reaccionar con los grupos sulfhídricos de sus aminoácidos y los flavonoles (junto con otros taninos) pueden inactivar otras proteínas de la misma manera [Murphy, 1999].

2.1.2.1.5 Propiedades farmacológicas.

A la fecha, no se han encontrado estudios que describan por completo la actividad farmacológica de RHTR. Sin embargo, se cuenta con evidencia de la actividad que presentan otras especies del género (Tabla 2) por lo que podría encontrarse alguna similitud en RHTR, ya que las especies pertenecientes a un género en particular comparten algunas características genotípicas y fenotípicas con el resto de los miembros del que forman parte, por lo cual un estudio más detallado podría aclarar dicha afirmación [Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010]. Los metabolitos secundarios identificados en RHTR podrían conferirle propiedades antiinflamatorias y antivirales, lo cual presenta un campo de estudio novedoso en la búsqueda de nuevos principios activos. Estudios recientes, sugieren que RHTR presenta compuestos con actividad quimiopreventiva, antimicrobiana, antiparasitaria y antineoplásica, las cuales fueron probadas con diferentes métodos analíticos.

Humason, (2005), al realizar una búsqueda de moléculas inhibitoras de la bomba de multirresistencia a drogas (*MDRP*) en plantas que son utilizadas en la medicina tradicional contra infecciones bacterianas, encontró que la fracción de RHTR obtenida con 80 % de hexano:acetato de etilo en cromatografía líquida al vacío, a partir de un extracto total elaborado en una mezcla 1:1 de acetato de etilo:MeOH, presentó actividad antimicrobiana a CI_{50} de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* y al utilizarse a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ en conjunto con berberina (30 $\mu\text{g/mL}$) sobre una cepa resistente a dicho antibiótico, logró inhibir su proliferación celular, posiblemente por la presencia de moléculas inhibitoras de la *MDRP* u otros mecanismos relacionados.

García-Ramírez (2015), estudió el efecto antiparasitario del EA de tallos y frutos de RHTR en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* empleando ensayos *in vitro* con sales de tetrazolio solubles en agua (*WST-1*) e *in vivo* con el modelo de absceso hepático amebiano (AHA) en hámster. Los ensayos *in vitro* revelaron actividad antimicrobiana de los tallos a CI_{50} de 10.42 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los frutos fueron de 17.13 $\mu\text{g/mL}$. Las pruebas *in vivo* revelaron que el extracto acuoso de tallos administrado a 0.05 g/mL, diariamente por vía oral en lugar del agua de bebida habitual durante 7 días, es capaz de disminuir el daño provocado por la inoculación intrahepática de *E. histolytica*, al igual que

Tabla 2. Actividad biológica y principios activos de algunas especies del género *Rhus*.

Especie	Órgano utilizado	Actividad biológica	Extracto o principio activo	Referencia
<i>R. verniciflua</i>	Corteza, duramen, ramas y tallos	Antifibrogénica, antimutagénica, antioxidante, antitrombótica, antitumorígenica y citotóxica	Buteina, garbanzol, sulfuretina, fisetina, fustina, molisacacidina, ácido protocatéquico, quercetina y ácido 6-pentadecilsalicílico	Lee y cols., 2003; Park y cols., 2004; Oshima y Kumantani, 1984; Lee y cols., 2002; Kuo y cols., 1991; Lee y cols., 2004.
<i>R. glabra</i>	Ramas	Antifúngica y antimicrobiana	Metil galato, 4-metoxi-3,5-ácido dihidroxibenzoico y ácido gálico	McCutcheon y cols., 1994; Saxena y cols., 1994.
<i>R. undulate</i>	Raíz	Antiinflamatoria	Apigenina dimetil éter,	Fourie y Snyckers, 1984.
<i>R. retinorrhoea</i>	Tallos	Antimalárica y antimicrobiana	7-O-metilnaringenina, eridictol, 7,3'-O-dimetilquercetina, 7-O-metilapigenina,	Ahmed y cols., 2001.
<i>R. coriaria</i>	Semilla, frutos, planta completa	Hipoglucémica, antioxidante y antimicrobiana	EA, EM y extracto etanólico, fraccionado con acetato de etilo.	Nasar-Abbas y Halkman, 2004; Sagdic y Ozcan, 2003; Bozan y cols., 2003; Giancarlo y cols., 2006.
<i>R. succedanea</i>	Savia y frutos	Antioxidante y antiviral	10'(Z),13'(E), 15'(E)-heptadecatrienilhidroquinona y derivados, robustaflavona, amentoflavona, volkensiflavona, succedaneaflavona y rhusflavanona	Wu y cols., 2002; Lin y cols., 1999.
<i>R. hirta</i>	Frutos	Antioxidante	EM	McCune y Johns, 2002.
<i>R. vernificera</i>	Savia	Leucopénica	Polisacáridos	Du y cols., 1999; Yang y Du, 2003.

FUENTE: Modificado de Rayne y Mazza, 2007.

el nivel de las transaminasas AST y ALT las cuales son indicadoras del daño tisular.

Abbott y cols. (1966) en el Servicio Nacional de Quimioterapia del Cáncer (CCNSC) en EE.UU., demostraron el efecto antineoplásico del extracto en EtOH:CHCl₃ al 50 % de hojas de RHTR en un modelo *in vivo* de cáncer, al utilizar una dosis de 125 mg/kg en ratones Swiss xenotrasplantados con sarcoma 180 y 100 mg/kg en hámster sirio con adenocarcinoma de duodeno. El tratamiento se administró diariamente por vía i.p. durante 7 días, con una inhibición en el peso de las masas tumorales del 35 % y 32 %

con respecto al control sin tratamiento. El EA de frutos, al ser administrado bajo las mismas condiciones a 500 mg/kg en ratones Swiss y 400 mg/kg en hámster sirio, obtuvieron una inhibición en el peso tumoral del 34 % y 33 % respectivamente.

Pettit y cols., (1974) demostraron que el extracto en EtOH al 50 % de hojas de RHTR, presentó una actividad citotóxica a 15 µg/mL sobre la línea celular KB (carcinoma epidermal de nasofaringe humano), cuyos ensayos fueron diseñados según criterios del Instituto Nacional del Cáncer en EE.UU.; ellos lograron aislar dos principios activos, el ácido gálico y el etil galato con un CI_{50} de 3.1 y 18 µg/mL respectivamente. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se encontró que el EA de tallos de RHTR contenía un compuesto de naturaleza flavonoide, de bajo peso molecular (~500 Da), soluble a temperatura ambiente y que precipita a pH ácido a 4 °C, el cual presentaba absorción de U.V. a 280 y 350 nm. Este compuesto presentó actividad antimetabólica equivalente a 10^{-4} M de vincristina sobre cultivos primarios de linfocitos provenientes de pacientes con leucemia linfoblástica aguda [Sánchez-Ramírez, 1985]. Más recientemente, Varela-Rodríguez (2013) y Saenzpardo-Reyes (2014) evaluaron el efecto citotóxico de los polifenoles presentes en el extracto de tallos de RHTR con MeOH al 70 %, sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon CACO-2 y de ovario SKOV-3, obteniéndose una CI_{50} a 10 y 20 µg/mL respectivamente. Al realizar un fraccionamiento del extracto mediante cromatografía en fase sólida, con elución de disolventes de distinta polaridad para concentrar los polifenoles presentes, se encontró una relación entre la actividad citotóxica y el contenido de los mismos, ya que fracciones obtenidas con agua ácida al 1 % y acetato de etilo tuvieron una actividad similar a 30 µg/mL de vincristina a 24 y 72 h de cultivo. Este efecto se evidenció a concentraciones inferiores a los 15 µg/mL, demostrando que RHTR contiene principios activos que pueden ser utilizados para combatir el cáncer y que posiblemente dicha actividad esté relacionada a la presencia de flavonoles identificados en el extracto, sin embargo se requieren más estudios que permitan el aislamiento del principio activo.

Rodríguez-Palomares (2014), estudió el efecto antioxidante del extracto de tallos de RHTR con MeOH al 70 % y de las fracciones elaboradas con agua ácida al 1 % y acetato de etilo por el método *ORAC* y *NBT*, encontrándose una alta concentración de

antioxidantes con 1819.19, 454.40 y 194.35 $\mu\text{mol/g}$ de equivalentes trolox (ET) respectivamente. Estos resultados, se relacionan con la concentración de polifenoles reportada por otros autores [Zalacaín-Aramburu, 2001], lo cual sugiere que RHTR podría ser utilizada en el tratamiento alternativo de enfermedades degenerativas vinculadas con el estrés oxidativo.

2.1.2.2 Efecto de los polifenoles sobre las rutas apoptóticas.

Generalmente los polifenoles actúan como quimiopreventivos contra el cáncer a través de la inducción de la apoptosis sobre células tumorales, ya que estas resultan ser más sensibles al efecto pro-apoptótico en comparación con las células normales [Ramos, 2008]. Existe evidencia que propone que la selectividad que tienen estos compuestos proviene de la inhibición de la enzima telomerasa [Mizushina y cols., 2005], una transcriptasa reversa especializada en el mantenimiento de los telómeros que tiene un papel importante en el proceso de inmortalización celular durante la carcinogénesis [Chakraborty y cols., 2006]. Se sabe que durante la fase de iniciación del cáncer, los polifenoles pueden intervenir sobre el metabolismo de los agentes carcinogénicos mediante: la inhibición de las enzimas de fase I, como el citocromo P450, *CYP1A1*, *CYP1B1*, citocromo b5 reductasa, QR que lleva a cabo reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, hidratación e isomerización; y/o la activación/modulación de la expresión génica de las enzimas detoxificantes de fase II como GPx, SOD, GST, UDP-glucuronosiltransferasa que están implicadas en reacciones de glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación [Yang, 2000 y Yu, 1997] mediante la modulación de *ARE* (5'-(G/A)TGACNNGC(G/A)-3' que se localiza en la región promotora de estas enzimas [Granado 2010]. Este efecto quimiopreventivo que presentan los polifenoles también está relacionado con la dosis que se utiliza, ya que bajas concentraciones promueven mecanismos de supervivencia mediante la activación de la vía de las *MAPKs* (*ERKs*, *JNKs*) o incremento en los niveles de *p-AKT* mientras que concentraciones elevadas ejercen un efecto pro-apoptótico mediante la activación de la cascada de caspasas y la reducción de los niveles fosforilados de *AKT* y *ERKs* [Nguyen y cols., 2004; Spencer y cols., 2003; Yu y cols., 1997]. En el caso de compuestos fenólicos

oxidantes, se ha visto que aumentan los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelular provocando la formación de peróxido de hidrógeno y generando la activación de la apoptosis, al producir cambios en la expresión de genes como p53, p300, *Apaf-1*, *NF- κ B*, p50 y p65 que provocan la inhibición del crecimiento de células cancerosas y muerte celular [Viveros y cols., 2010]. La modulación de las vías de transducción de señales *PI3K/AKT*, *MAPKs* (*ERKs*, *JNKs*, *p38* y *MAPKs*) *PKCs*, *AP-1* y *NF- κ B* está relacionada con la regulación de la supervivencia, proliferación y muerte celular programada [Ballif y Blenis, 2001], sugiriéndose que la inactivación de *NF- κ B* por los polifenoles está mediada en parte por la inactivación de las quinasas *AKT* y/o *MAPKs*, apuntando hacia una conexión entre ambas vías de señalización [Gong y cols., 2003] (Figura 3).

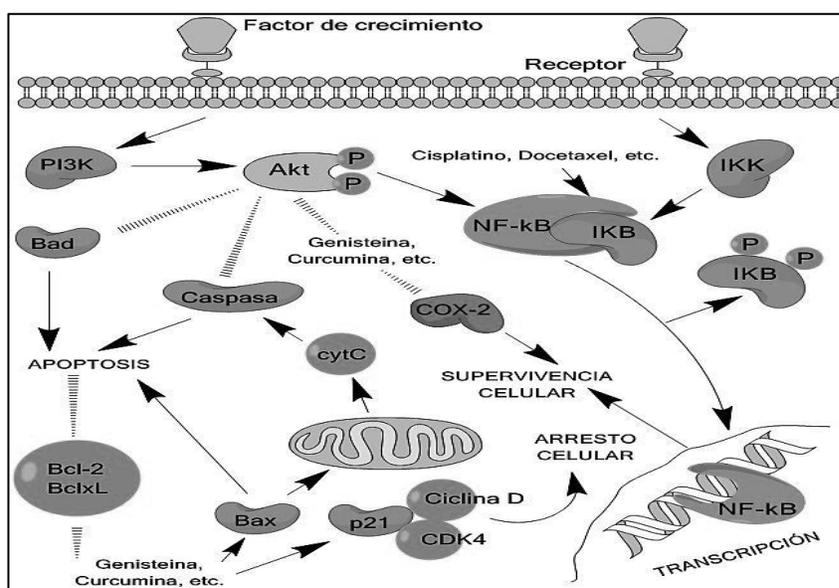


Figura 4. Mecanismos de acción molecular de diferentes agentes quimiopreventivos dentro de la célula [FUENTE: Sarkar y Li, 2007].

2.2 CÁNCER DE OVARIO.

Entre los tumores ginecológicos, los tumores anexiales suelen ser los más difíciles de diagnosticar. Los tumores de ovario, situados en la profundidad del abdomen, crecen insidiosamente y suelen alcanzar un gran tamaño antes de ser advertidos [Pons y cols., 2012]. Pueden aparecer diversos síntomas por compresión de estructuras adyacentes, ya sea por el propio tumor o por los órganos vecinos que infiltra [Hossfeld y cols., 1992]. Esta clase de tumor suele producir implantes peritoneales y secundariamente ascitis. Los tumores que aparecen en los ovarios presentan una llamativa variedad de características histológicas y biológicas [Gallardo, 2006]. Su histogénesis y clasificación son todavía objeto de controversia (Tabla 3). De acuerdo con su comportamiento pueden ser benignos, de malignidad límite o malignos [Hossfeld y cols., 1992]. Existen tres tipos principales de tumores ováricos; los tumores epiteliales que se originan de las células que cubren la superficie externa del ovario, los tumores de células germinales que se originan de las células que producen los óvulos y los tumores estromales que se originan de las células del tejido estructural que sostienen el ovario y producen hormonas femeninas (Tabla 3). No se conocen las causas del cáncer de ovario. Éste suele aparecer en mujeres mayores de 35 años y las más afectadas son las mayores de 50 años. El cáncer de ovario es más frecuente entre las mujeres caucásicas en comparación con las demás. Aquéllas que tengan algún miembro de su familia que haya tenido cáncer de ovario, mama o de colon, tienen más posibilidades de desarrollar esta enfermedad; así como aquéllas que hayan padecido alguna de las anteriores [Pons y cols., 2012]. Se ha comprobado que los siguientes factores aumentan el riesgo de sufrir cáncer de ovario: tener el primer periodo menstrual a una edad temprana, tener menopausia tardía, el uso de drogas para aumentar la fertilidad y no haber tenido hijos, el tratamiento hormonal después de la menopausia, el uso de talco en el área genital y la exposición al asbesto [Poveda, 2006]. De igual manera se ha comprobado que los siguientes factores disminuyen el riesgo de padecerla, tales como: el uso de pastillas anticonceptivas, tener hijos, amamantar, la ligadura de trompas y la extirpación del útero y los ovarios [Poveda, 2006]. El pronóstico de la enfermedad depende de su extensión.

En los casos de T1 y T2, la supervivencia a los 5 años alcanza el 60-70 %. En los casos avanzados que responden a la quimioterapia, dicha supervivencia es del 30 %, pero no se estabiliza en los años posteriores; el número de curaciones en estos casos es probablemente mínimo [Hossfeld y cols., 1992]. Por ello, es preciso que se desarrollen nuevos medicamentos quimioterápicos que sean eficaces contra esta enfermedad. La diseminación ocurre cuando los tumores ováricos se extienden a los ganglios linfáticos paraaórticos, mediastínicos y supraclaviculares. Posteriormente se produce metástasis pulmonar y hepática. Son frecuentes las complicaciones intraabdominales, como la obstrucción intestinal o uretral. En estadios avanzados aparecen caquexia y ascitis que producen una “facies ovárica” característica [López y cols., 2006].

Tabla 3. Clasificación modificada de la OMS de los tumores de ovario.

I. Tumores epiteliales comunes	
A. Seroso	a) Benigno
B. Mucinoso	b) Malignidad limite (<i>borderline</i>)
C. Endometriode	c) Carcinoma
D. Mesonefroide (De células claras)	
E. Brenner	
F. Epitelial mixto	
G. Carcinoma indiferenciado	
H. Inclasificable	
II. Tumores del estroma de los cordones sexuales	
A. Células de la granulosa/teca	a) Benigno
B. Androblastoma (células de Leyding-Sertoli)	b) Maligno
C. Ginandroblastoma	
D. Inclasificables	
III. Tumores de células lipídicas	
IV. Tumores de células germinales	
A. Disgerminoma	
B. Tumor del seno endodérmico	
C. Carcinoma embrionario	
D. Poliembrioma	
E. Coriocarcinoma	
F. Teratoma	
Inmaduro	
Maduro (sólido o quístico)	
Monodérmico (del estroma ovárico y/o carcinoide, otros)	

FUENTE: Hossfeld y cols., 1992.

2.2.1 Tumores epiteliales.

Suponen un 40 % de todos los tumores ováricos. Pueden ser de dos tipos, serosos y mucinosos. Ambos tienen tendencia a desarrollarse bilateralmente y a formar

implantes en la cavidad peritoneal [Hossfeld y cols., 1992]. En un determinado porcentaje se producen cambios malignos, lo que es más frecuente en los serosos [Pons y cols., 2012]. El cistadenocarcinoma papilar pseudomucinoso es una variedad con un gran potencial de diseminación locorregional. Son menos frecuentes los tumores endometrioides, mesonefroides y de Brenner [Gallardo y cols., 2011].

2.2.2 Diagnóstico.

Existen dos sistemas de clasificación internacionalmente reconocidos y de uso habitual: el sistema TNM de la UICC y el de la FIGO, que se resumen en la Tabla 4 [Hossfeld y cols., 1992]. La localización de los ovarios prácticamente impide la detección precoz. El diagnóstico se basa en tres tipos de síntomas, que a menudo aparecen tardíamente en la enfermedad:

- A) Síntomas compresivos, debido al crecimiento del tumor primario y la infiltración de tejidos adyacentes.
- B) Síntomas de diseminación por la implantación peritoneal, que se manifiesta como ascitis.
- C) Síntomas hormonales que producen desfeminización, masculinización o hiperestrogenismo en grado muy variable, dependiendo del tipo tumoral y de la edad de la paciente.

La exploración ginecológica y la palpación abdominal pueden revelar la existencia del tumor o de masas pélvicas, cuya consistencia varía de quística a sólida [Pons y cols., 2012]. La exploración física raras veces permite establecer la naturaleza exacta de la tumoración. Mediante ultrasonografía (USG) abdominal/transvaginal o con la tomografía axial computarizada (TAC), se puede obtener importante información sobre el tamaño y la extensión de la lesión antes de la cirugía [Poveda, 2006]. La laparotomía exploradora con biopsia es el método diagnóstico más exacto, ya que demuestra la naturaleza y la extensión de la enfermedad, así como el tratamiento a seguir [Martínez-Tlahuel y cols., 2006]. En los casos avanzados con afectación ganglionar supraclavicular, se puede establecer el diagnóstico con la biopsia de los ganglios. Inicialmente, la presencia de células neoplásicas en el líquido ascítico puede orientar el diagnóstico.

Tabla 4. Clasificaciones TNM y FIGO de los tumores ováricos.

Categorías TNM	Estadios FIGO	
Tx		No se puede evaluar el tumor primario.
T0		No hay pruebas del tumor primario.
T1	I	Tumor limitado a los ovarios.
T1a	IA	Tumor limitado a un ovario, con la cápsula intacta, no hay tumor en la superficie del ovario.
T1b	IB	Tumor limitado al interior de ambos ovarios, cápsulas intactas; no hay tumor en la superficie.
T1c	IC	Tumor limitado a uno o los dos ovarios con: cápsula rota, o tumor en la superficie del ovario o células malignas en ascitis o lavado peritoneal.
T2	II	El tumor afecta a uno o los dos ovarios y se extiende a la pelvis
T2a	IIA	Extensión y/o implantes en útero y/o trompas.
T2b	IIB	Invasión de otros tejidos pélvicos.
T2c	IIC	Extensión pélvica (2a o 2b) con células malignas en la ascitis o lavado peritoneal.
T3 y/o N1	III	El tumor afecta a uno o los dos ovarios y hay metástasis peritoneales fuera de la pelvis microscópicamente confirmada y/o metástasis ganglionares regionales.
T3a	IIIA	Metástasis peritoneales microscópicas fuera de la pelvis.
T3b	IIIB	Metástasis peritoneales macroscópicas fuera de la pelvis, de menos de 2 cm de diámetro máximo.
T3c y/o N1	IIIC	Metástasis peritoneales fuera de la pelvis de más de 2 cm de diámetro y/o metástasis ganglionares regionales.
M1	IV	Metástasis a distancia (no las peritoneales).

FUENTE: Hossfeld y cols., 1992.

2.2.3 Mecanismo de carcinogénesis.

Actualmente no existen marcadores confiables que indiquen la presencia de carcinomas en estadios iniciales y asintomáticos. El CA-125 está solamente reconocido como útil en el monitoreo de la progresión de un carcinoma de ovario ya diagnosticado. Adicionalmente, el cáncer epitelial puede expresar fenotipos diferentes, mostrando tener propiedades pertenecientes al epitelio tubárico (carcinoma seroso o cilioepitelial), al endometrio (tumores endometrioides), al endocérvix y al intestino grueso (mucinosos) o al tracto urogenital (tumores de células claras) [Hossfeld y cols., 1992]. Estos diferentes tipos histológicos que conocemos tienen una diferente clínica, capacidad de respuesta al tratamiento e incidencia; nada sabemos acerca de los determinantes que sirven de base para estas variaciones. Los estudios experimentales llevados a cabo en el epitelio

superficial del ovario y su carcinogénesis en animales comunes de laboratorio se han dificultado, debido a que éstos no desarrollan de manera adecuada el cáncer epitelial de ovario y, aunque raros, éstos suelen derivar de la granulosa, las células estromales o de las germinales. Además, su epitelio mesotelial es frágil, difícil de aislar y mantener bajo condiciones experimentales, ya que dicho epitelio es sensible y capaz de modular su fenotipo en respuesta a las condiciones externas del medio. En ooforectomías profilácticas realizadas en mujeres con historial familiar de cáncer ovárico, la inmunohistoquímica ha revelado la presencia de mutaciones genéticas del *BCRA-1*, *BCRA-2*, p53, *ErbB2* y E-Cadherina [Hossfeld y cols., 1992].

2.2.4. Tratamiento.

El tratamiento de elección es la cirugía. En los estadios precoces la intervención típica es la histerectomía abdominal con salpingooforectomía biliar. La extensión de la cirugía se justifica por la alta incidencia de bilateralidad y la tendencia a invadir el cuerpo uterino. La quimioterapia administrada postoperatoriamente será eficaz con mucha mayor probabilidad si el volumen tumoral es muy pequeño. Las tomas de biopsia deben ser múltiples e incluir el epiplón, los ganglios paraaórticos y la superficie inferior del diafragma. En los tumores T1 y T2 (Estadios I y II de la FIGO), generalmente está indicada la administración de radioterapia únicamente en la zona de la pelvis o bien, sobre toda la cavidad abdominal; en estadios más avanzados puede utilizarse, pero está siendo desplazada cada vez más por la quimioterapia. El cisplatino y la ciclofosfamida, utilizados conjuntamente producen un 30 % de remisiones completas patológicamente comprobadas y hasta un 50 % de remisiones parciales [Micetick y cols., 1985]. La mitad de estas últimas se encuentran en la categoría denominada “enfermedad residual mínima”, que se define como la presencia de tumoraciones peritoneales menores de 2 cm. Ni la continuación de la quimioterapia intravenosa, ni la radioterapia abdominal consiguen erradicar estas lesiones. Se ha encontrado hasta un 30 % de respuestas completas mediante la instalación peritoneal de cisplatino [Micetick y cols., 1985]. Raramente, se administran actualmente radioisótopos colocados intraperitonealmente; puede que los interferones sean activados por esta vía [Hossfeld y cols., 1992].

Uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer de ovario, es la resistencia clínica a drogas citostáticas, que puede presentarse en el momento del diagnóstico o durante la administración de la droga. Existe una variedad de alteraciones que hacen a las células neoplásicas capaces de protegerse contra un amplio espectro de agentes tóxicos. Algunos de los mecanismos son: cambios en la expresión o actividad de la enzima topoisomerasa, alteraciones en los niveles de la enzima glutatión-S-transferasa y un aumento en la expresión de los genes *MDR-1*, que codifican para la glicoproteína de membrana plasmática Gp-P [Lizano y Barrera, 1993]. Se ha descrito una variedad de mecanismos por los cuales dichas células adquieren el fenotipo *MDR*, incluyendo la absorción reducida del fármaco, la modificación genética de los objetivos específicos de la droga, el aumento en la capacidad de reparación del daño en el ADN, la capacidad reducida de la inducción de la apoptosis y el aumento en la tasa de desintoxicación de los compuestos [Araujo y cols., 2011]. Debido a dicha resistencia, se han desarrollado nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer; como el empleo de distintas terapias combinando varios agentes citostáticos los cuales presentan mecanismos de acción únicos, lo que resulta en una mayor eficacia [Sarkar y Li, 2007]. Por esta razón la terapia con quimiopreventivos, que implica el uso de productos naturales para revertir, suprimir o evitar lesiones premalignas antes de la aparición de la metástasis, ha aparecido como un enfoque novedoso en el control de las enfermedades neoplásicas [Haque y cols., 2010].

3. JUSTIFICACIÓN.

Entre los diferentes fenotipos de cáncer ginecológico, el cáncer de ovario es considerado el más letal y representa la cuarta causa de muerte entre las mujeres en México. La aparición de resistencia a los medicamentos administrados durante y después de la quimioterapia, hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para esta enfermedad y las plantas representan una gran fuente de metabolitos secundarios con este fin. Tal es el caso de RHTR, que es utilizada tradicionalmente para el tratamiento del cáncer. Estudios previos, han revelado actividad inhibitoria de algunas líneas celulares de cáncer, por lo cual resulta importante continuar el estudio de su actividad antineoplásica en el cáncer de ovario, para validar su potencial terapéutico e identificar compuestos activos contra esta enfermedad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Tendrán los principios activos de RHTR un efecto antineoplásico durante su administración como tratamiento en roedores xenotrasplantados con células de cáncer de ovario humano?

5. HIPÓTESIS.

Los principios activos en RHTR presentan un efecto antineoplásico al administrarse como tratamiento en un modelo murino xenotrasplantado con cáncer de ovario humano, disminuyendo las dimensiones de los tumores desarrollados por la activación de mecanismos moleculares involucrados en la supresión del crecimiento o la muerte celular tumoral.

6. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar la actividad antineoplásica de los principios activos de RHTR en un modelo murino xenotrasplantado con cáncer ovárico humano.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

6.2.1 Composición fitoquímica.

- Determinar la composición fitoquímica de RHTR mediante estudios metabolómicos.
- Realizar la purificación e identificación de compuestos en RHTR.

6.2.2 Actividad biológica.

- Evaluar la actividad biológica de los compuestos presentes en RHTR e identificar nuevos candidatos terapéuticos para el cáncer de ovario.
- Determinar *in silico* las propiedades moleculares y farmacológicas de los principios activos de RHTR.
- Estudiar el potencial antineoplásico de los principios activos de RHTR sobre ratones xenotrasplantados con cáncer de ovario.
- Estudiar el efecto de los principios activos de RHTR en cultivos celulares y tumores generados en los ratones inmunodeficientes.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

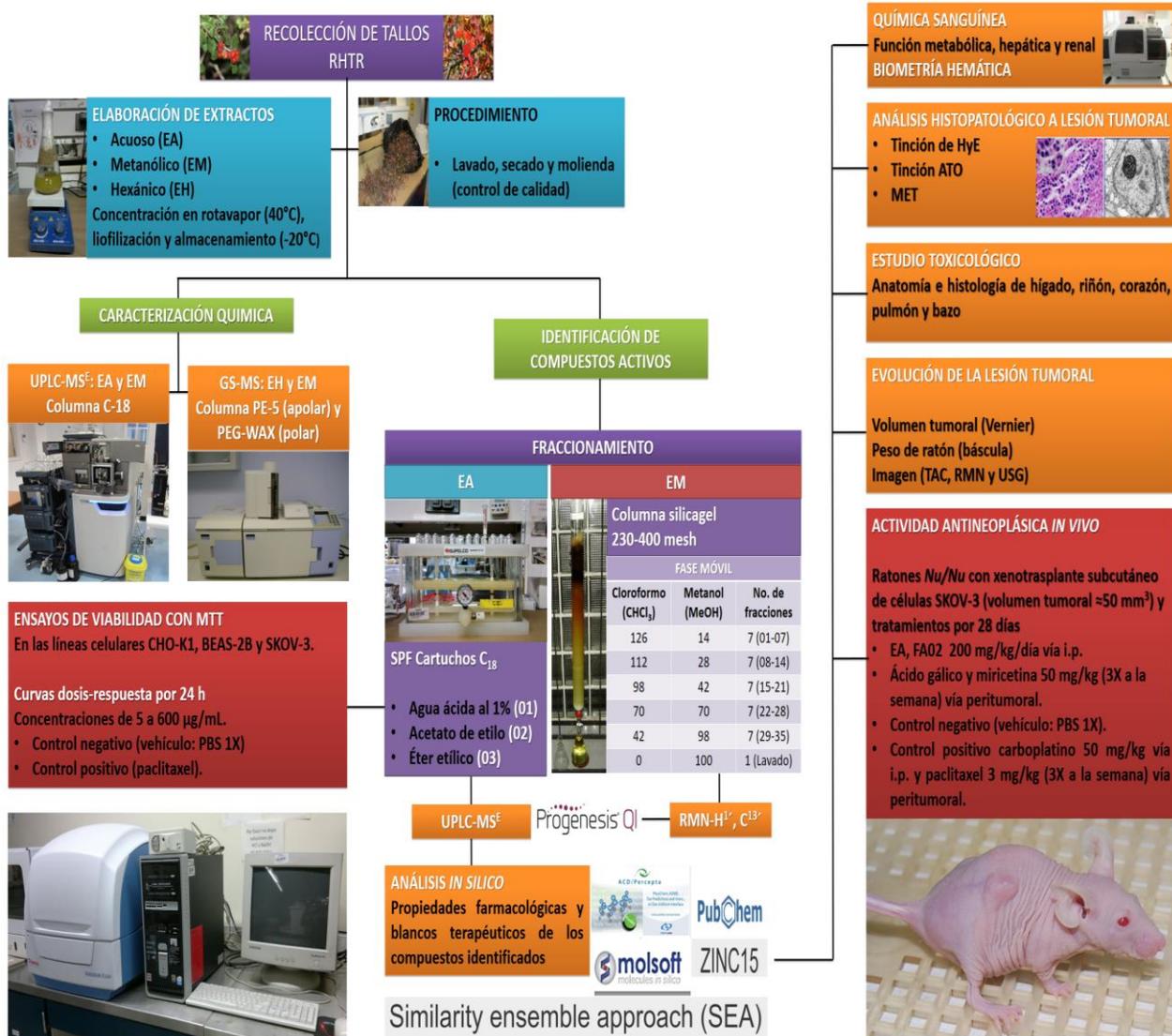


Figura 5. Estrategia experimental implementada para evaluar la actividad biológica de los principios activos en RHTR.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 MATERIALES.

Todos los reactivos utilizados en los experimentos fueron grado ACS, HPLC o MS de Sigma© Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.) para: ácido fórmico (N° 14265), ácido gálico (G7384), metil galato (274194), miricetina (M6760), miricitrina (91255), quercetina (Q4951), quercitrina (Q3001), fisetina (F4043), paclitaxel (T7402), 2-propanol (I-0398), paraformaldehído (P6148), MTT (M5655), ácido fórmico (F0507) o de J.T.Baker (Avantor™, Pennsylvania, EE.UU.) para: acetonitrilo (JT-9821), metanol (JT-9822), hexano (JT-9304), ácido acético (JT-9515), agua (JT-9825), éter etílico (JT - 9237), ácido clorhídrico (JT - 9535), etanol (JT - 9014). Los reactivos de cultivo celular se utilizaron estériles de Sigma© o Gibco™ (Grand Island, NY, EE.UU.) como: penicilina (P3032), gentamicina (G1272), estreptomycin (S9137), solución tripsina-EDTA (T3924), SFB (26140-079), azul de tripán (T6146), DMEM (D5796), McCoy 5A (M9309), DMSO (D4540), Triton™ X-100 (T8787). El equipo utilizado para este proyecto fue molino (Pulvex, México), liofilizadora (Labconco, EE.UU.), sistema Milli-Q SimplicityR UV (Millipore, EE.UU.) y rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) para la preparación de extractos y fracciones, así como espectrofotómetro Varioskan® Flash (Thermoscientific, EE.UU.) para las pruebas colorimétricas; los demás equipos fueron indicados en el texto.

8.2 METODOLOGÍA.

8.2.1 Recolección del material vegetal.

De acuerdo a la experiencia de las personas que han utilizado la decocción de *R. trilobata* Nutt. (*Anacardiaceae*), las muestras fueron colectadas en mayo del 2014 en el Cerro Pelón ubicado en la localidad Colonia Independencia, Municipio de Namiquipa en Chihuahua, México (mapa topográfico INEGI H13C42 y coordenadas geográficas GPS: 29°5'59''N, 107°32'33''W a 1,960 m.s.n.m.) bajo la supervisión de la M. en C. Sonia Rodríguez de la Rocha. La recolección se realizó de manera manual con pinzas de poda, al medio día con clima templado y soleado para evitar de esta manera el rocío de la

mañana. No se recolectaron ejemplares completos o raíces para permitir la regeneración. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en ausencia de luz y se retiraron las hojas y los frutos. Posteriormente, los tallos se lavaron con agua potable para eliminar los contaminantes y se secaron sobre toallas de papel absorbente durante 48 h a temperatura ambiente. Finalmente, los tallos se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm por tamizado y se liofilizaron para su almacenamiento a 4 °C. La identificación taxonómica de RHTR se realizó con base en la morfología macroscópica y microscópica, utilizándose un estereoscopio Leica® EZ4HD, para hacer observaciones de sus hojas, flores y frutos. La validación de las muestras fue realizada por la D.C. María de la Luz Arreguín Sánchez, curadora del herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y por la Biol. Laura de León Pesqueira, curadora del Herbario del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

8.2.2 Preparación y fraccionamiento de los extractos de la planta.

Las muestras para la caracterización fitoquímica se obtuvieron por maceración de 25 g de tallos en 500 mL de MeOH al 70 % (extracto metanólico, EM) y hexano (extracto hexánico, EH) durante 48 h bajo agitación constante a temperatura ambiente y oscuridad. La preparación tradicional de RHTR fue por decocción, utilizándose 25 g de tallos en 500 mL de H₂O destilada hirviendo durante 30 min (extracto acuoso, EA). Posteriormente, los extractos se filtraron y se centrifugaron a 2,500 rpm durante 15 min a 4 °C en tubos cónicos para recuperar los sobrenadantes y concentrarlos a presión negativa en un rotavapor a 5 rpm y 40 °C. Finalmente, los extractos se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C en recipientes ámbar. El fraccionamiento del EA se realizó por extracción en fase sólida con un colector al vacío (Visiprep™, Sigma©) y cartuchos ENVI™-C₁₈ (Supelclean™, Sigma©) activados con 20 mL de MeOH y 1 % de ácido acético. Los disolventes utilizados en gradiente de polaridad fueron: 15 mL de ácido acético al 1% (fracción acuosa 01, FA01), acetato de etilo (fracción acuosa 02, FA02) y éter etílico (fracción acuosa 03, FA03). Finalmente, los cartuchos se lavaron con 20 mL de MeOH y se reutilizaron tres veces. Las fracciones se evaporaron al vacío, se pesaron y se

disolvieron en 2 mL de MeOH al 50 % para ser esterilizadas por filtración con filtros de jeringa de PTFE de 0.20 µm (Corning®) y almacenarse como soluciones madre en viales ámbar a - 20 °C hasta su uso.

8.2.3 Caracterización fitoquímica de RHTR.

8.2.3.1 Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (RP-UPLC-PDA-QTOF-MS).

La identificación de compuestos en RHTR se realizó en el EA, EM y FA02 empleándose un *UPLC* (Acquity™, Waters®) con detector *PAD* y acoplado a un equipo *MS* (Synapt™ G1, Waters®). El instrumento fue equipado con una columna Acquity™ UPLC CSH-C₁₈ (2.1 x 150 mm, 1.7 µm, Waters®) con precolumna y la fase móvil utilizada fue H₂O purificada (A) con un sistema Milli-Q y acetonitrilo (B) (ambos acidificados al 0.1 % con ácido fórmico, v/v). Los disolventes se desgasificaron mediante sonicación con baño ultrasónico (Branson™ 1800, Emerson™) y el gradiente utilizado fue el siguiente: 0 min, 95 % A (paso de equilibrado); 0.5 min, 95 % A; 20 min, 25 % A; 25 min, 25 % A; 25.5 min, 10 % A; 27.5 min, 10 % A; 27.6 min, 95 % A (etapa de lavado); 32 min, 95 % A (paso de reequilibrio). Las muestras se prepararon a 1 mg/mL y se filtraron con filtro de jeringa de PTFE 0.20 µm (Captiva Econo Filter, Agilent®) y se mantuvieron a 4 °C durante el ensayo. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: El flujo se mantuvo a 0.2 mL/min a lo largo del gradiente, desde el sistema *UPLC* hasta el detector *MS*. El volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. Las muestras se analizaron mediante detector *PAD* a 280 nm y por fuente de ionización en *electro spray* (ESI), usándose en modo negativo y positivo (modo *wave*). Los espectros fueron adquiridos en *full scan* con un rango de masa de 50 a 1500 m/z en modalidad *MS^E*. La energía de colisión de iones precursores se ajustó a 6 eV y en la sección de transferencia de 20 a 40 eV. Los valores óptimos para los parámetros ESI-MS fueron: voltaje capilar, 3.0 kV; cono de muestreo, 35.0 V; cono de extracción, 4.0 V; temperatura de fuente y desolvatación, 150 °C y 350 °C; cono y flujo de desolvatación del gas, 20.0 L/h y 600 L/h, respectivamente. Durante el desarrollo del método, la leucina encefalina (Waters®) se utilizó como masa de referencia (556.2771, M+H), la cual se inyectó

directamente en la interfaz del equipo a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ y una concentración de 2 ng/mL , permitiendo la calibración interna de las masas adquiridas cuyo error fue de $\approx 4,54$ ppm durante el análisis. Los datos de *MS* se adquirieron en *continuum mode* y se procesaron a través del software MassLynx® (versión 4.1, Waters®) y Progenesis® QI para moléculas pequeñas (Nonlinear Dynamics versión 2.3, Waters®). La identificación presuntiva de compuestos se realizó por comparación con el patrón de fragmentación obtenido y el de estándares adquiridos comercialmente, así como los reportados en bases de datos para plantas, aceptándose las identificaciones de isótopos con una similitud superior al 90 %. El análisis se realizó con la colaboración del D.C. José Juan Ordaz Ortiz del Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas en LANGEBIO.

8.2.3.2 Cromatografía de Gases (GC-FID-MS).

La identificación de los compuestos volátiles presentes en RHTR se realizó en el EM y EH empleándose un GC (AutoSystem XL™, PerkinElmer®) acoplado a un equipo de MS (TurboMass™ Gold 7.0, PerkinElmer®). El instrumento fue equipado con una columna capilar de metilfenil silicona 5 % (PE-5) (60 m x 0.25 mm, 0.25 μm , Agilent®) para compuestos apolares y polietilenglicol (PEG) Carbowax 20M (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm Agilent®) para compuestos polares. La rampa de temperatura utilizada para limpiar la columna fue de 200 °C, 15 min y el gradiente utilizado en el ensayo fue el siguiente: 60 °C, 1.7 min (15 °C / min); 170 °C, 0 min (5 °C / min); 220 °C, 20 min. Las muestras se prepararon a 10 mg/mL y se filtraron con filtro de jeringa de PTFE de 0.20 μm (Captive Econo Filter, Agilent®). Las condiciones durante la corrida fueron las siguientes: se ajustó el caudal del gas helio a 1 mL/min a lo largo del gradiente, desde el sistema GC al detector MS. El volumen de inyección fue de 2 μL con una jeringa de Hamilton y el retraso del disolvente para el hexano fue de 5 min y para el MeOH de 3 min respectivamente. Las muestras se analizaron mediante un detector de ionización de llama (*FID*) y por impacto electrónico (*EI*). Los espectros de masas se adquirieron en un rango de 50 a 500 m/z . Los valores óptimos para los parámetros *IE-MS* fueron: temperatura del detector/inyector, 250 °C y temperatura del filamento, 120 °C. Los datos de *MS* se procesaron a través del software TurboMass® (versión 5.4, PerkinElmer®), mientras la identificación presuntiva

de compuestos se realizó por comparación con el patrón de fragmentación obtenido y los reportados en la librería de la plataforma NIST, aceptándose las identificaciones de isótopos con una similitud superior al 90 %. El análisis se realizó con el apoyo de la D.C. Erika Salas Muñoz de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH.

8.2.3.3 Aislamiento e identificación de compuestos químicos.

La purificación de compuestos en RHTR, se realizó por cromatografía en columna abierta (CC) (1.5 x 5 cm de diámetro, Econo-Column® Bio-Rad®) y una fase estacionaria de silica gel de 60 Å y 230-400 mesh (1 g, Merck®), la cual fue empacada para fraccionar 15 g de EM, con una fase móvil de CHCl₃:MeOH en polaridad creciente (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 3:7 y MeOH 100 %, v/v) hasta obtener un total de 36 fracciones de 20 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas en un colector de fracciones CF-2 con detector UV 280 (Spectrum®). En la fracción No. 5 (CHCl₃:MeOH 9:1, v/v), se logró purificar 10 mg de metil galato (C₈H₈O₅), el cual fue identificado por espectrometría de RMN, al comparar el espectro obtenido con los existentes en bases de datos. Los ensayos de RMN mono-dimensional, consistieron en disolver 5 mg del compuesto en 700 µL de metanol tetradeuterado CD₃OD (Sigma©) en un tubo para resonancia de 178 x 5 mm (Sigma©), el cual fue colocado en un equipo Varian Mercury 300 MHz (Varian®) a 25 °C para la determinación de los espectros de RMN-¹H durante 10 min a 1 h y RMN-¹³C por 4 a 24 h, empleándose como referencia interna tetrametilsilano (TMS, Sigma©). Finalmente, los desplazamientos químicos obtenidos (δ) en los espectros de RMN para C₈H₈O₅, se reportaron en ppm a partir de la señal del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. El ensayo se realizó con la colaboración del D.C. Carlos Martin Cerda García-Rojas del Departamento de Química en CINVESTAV.

8.2.4 Propiedades *in silico* de los compuestos identificados.

Se llevó a cabo un análisis *in silico* de los compuestos más abundantes en FA02, para predecir sus propiedades farmacológicas, mediante el modelo “*drug-likeness*” en el programa Molsoft© (<http://molsoft.com/mprop/>), el cual clasifica la actividad como: nula/tóxica ($- \geq 0$) y activos carentes de toxicidad ($0 \leq +$), con base en los criterios de

Lipinski (relación estructura-actividad). Seleccionados los candidatos, se adquirieron comercialmente en Sigma© con una pureza $\geq 90\%$, para realizar ensayos *in vitro* de actividad biológica (apéndice 8.2.6). Una vez identificados los principios activos en RHTR, se realizó una búsqueda de sus propiedades moleculares y farmacológicas en PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y ACD/I-Labs© (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>).

La identificación de los farmacóforos blanco, se llevó a cabo mediante un enfoque inverso proteína-ligando, para encontrar proteínas con sitios de unión para los principios activos. Con este fin, se realizó la consulta de Zinc15 (<http://zinc15.docking.org/>) [Sterling y Irwin, 2015] y SEA (<http://sea.bkslab.org/>) [Keiser y cols., 2007], propiedad del Departamento de Química Farmacéutica en la Universidad de California (San Francisco, EE.UU.), los cuales utilizan el modelo de “*similarity ensemble approach*”. Finalmente, los potenciales blancos se seleccionaron con base en los parámetros *P-Value* o *Max TC*, proporcionados por el servidor.

8.2.5 Líneas celulares como modelos de estudio experimental *in vitro*.

Para evaluar la actividad citotóxica de los principios activos de RHTR, se utilizó la línea celular SKOV-3 (Cat. HTB-77TM), la cual proviene de un adenocarcinoma ovárico humano y como control de células normales se emplearon las líneas celulares transformadas no tumorales CHO-K1 (Cat. CCL-61TM), proveniente de una biopsia de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) y BEAS-2B (Cat. CRL-9609TM), proveniente de una biopsia de pulmón humano, las cuales fueron adquiridas de la ATCC® y se describen con mayor detalle en el apartado correspondiente. Las líneas celulares CHO-K1 y BEAS-SB se obtuvieron gracias al apoyo del D.C. José Eduardo Pérez Salazar del Departamento de Biología Celular en CINVESTAV-IPN y a la D.C. Julieta Rubio Lightbourn del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, respectivamente.

8.2.5.1 Línea celular SKOV-3.

La línea tumoral se aisló en 1973, del líquido ascítico de un adenocarcinoma ovárico de mujer caucásica de 64 años. Su capacidad tumorigénica ha sido probada en ratón (*nude-mice*) formando adenocarcinomas moderadamente diferenciados, consistente con

cáncer de ovario primario grado II. Las células presentan las isoenzimas *AK-1*, *ES-D*, *G6PD*, *GLO-1*, *Me-2*, *PGM1*, *PGM3* y son resistentes al *TNF* (factor de necrosis tumoral), a la toxina difteria y a drogas citotóxicas como adriamicina o cisplatinos. En el análisis citogenético se encontraron 43 cromosomas en el 63.3% de las células, con una tasa del 32 % de ploidías y los cromosomas marcadores del (1)(q21), der(13)t(1;?;13) (q11;?;q34), der(11)t(11;?) (q12) y del(10)(q22). En el perfil genómico se encontró amelogenina:X, CSF1PO:11, D13S317:8,11, D16S539:12, D5S818:11, D7S820:13,14, THO1:9,9.3, TPOX:8,11 y vWA:17,18. Las células adherentes son indiferenciadas durante la fase de crecimiento exponencial y tras alcanzar la confluencia celular en la fase estacionaria forman una monocapa de células polarizadas (Figura 6). El tiempo en el que estas células doblan su población es de unas 62 h aproximadamente.

8.2.5.2 Línea celular CHO-K1.

La línea no tumoral, se obtuvo originalmente de una subclona de la línea celular parental CHO, iniciada a partir de una biopsia del ovario de un hámster chino adulto (*Cricetulus griseus*) en 1957. Las células presentan susceptibilidad al virus de la estomatitis vesicular y al virus Getah; así como una resistencia al virus Modoc, Willow Button y Poliovirus-2. En el análisis citogenético, se encontraron 22 cromosomas hipodiploides. Las células son adherentes y forman una monocapa durante la confluencia (Figura 7).

8.2.5.3 Línea celular BEAS-2B.

La línea no tumoral, fue obtenida en 1989 por R.R. Reddel a partir de tejido pulmonar humano de individuos sanos no cancerosos. Las células epiteliales bronquiales se aislaron y se transformaron con un hibridoma de adenovirus 12-SV40 (Ad12SV40), las cuales conservan adherencia y la capacidad de experimentar diferenciación escamosa en respuesta al suero. La línea celular no resulto tumorigénica en ratones inmunosuprimidos, pero si fue capaz de formar colonias en medio semisólido y con tinción positiva para queratina y antígeno T de SV40. En el perfil genómico se encontraron secuencias para poliomavirus y amelogenina:XY, CSF1PO:9,12, D13S317:13, D16S539:

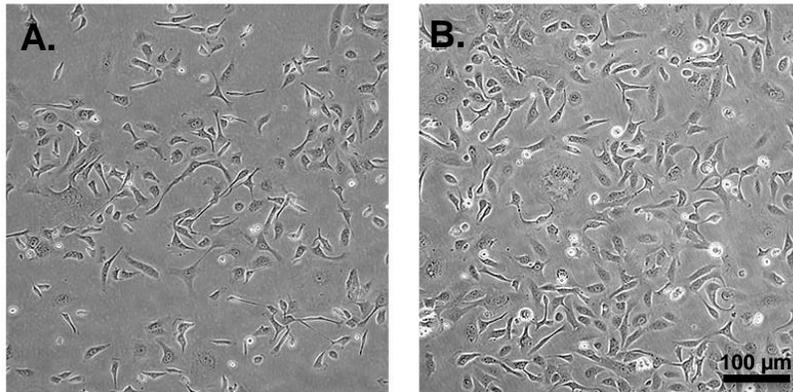


Figura 6. Microfotografías de células SKOV-3 en cultivo. (A), Células en un cultivo no confluyente; (B), células en un cultivo confluyente. Aumento original 10X. Microscopía de contraste de fases (FUENTE: ATCC).

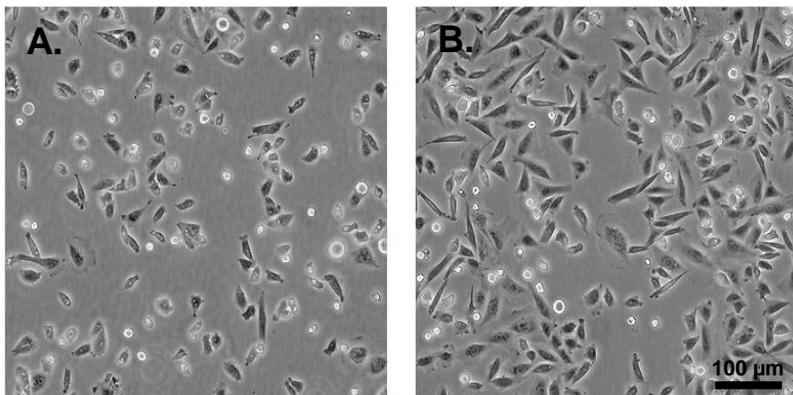


Figura 7. Microfotografías de células CHO-K1 en cultivo. (A), Células en un cultivo no confluyente; (B), células en un cultivo confluyente. Aumento original 10X. Microscopía de contraste de fases (FUENTE: ATCC).

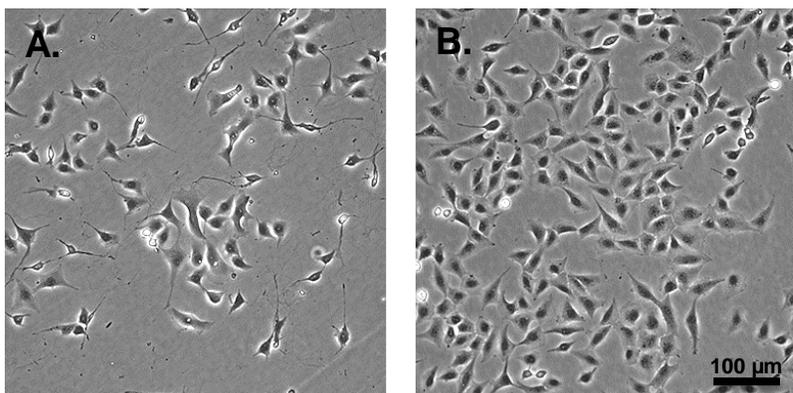


Figura 8. Microfotografías de células BEAS-2B en cultivo. (A), Células en un cultivo no confluyente; (B), células en un cultivo confluyente. Aumento original 10X. Microscopía de contraste de fases (FUENTE: ATCC).

12, D5S818:12,13, D7S820:10,13, THO1:7,9.3, TPOX:6,11 y vWA:17,18 (Figura 8).

8.2.5.4 Mantenimiento de los cultivos celulares.

Las monocapas celulares se mantuvieron hasta alcanzar un 80 % de confluencia, en cajas de plástico de 25 cm² (Corning®) con 10 mL (0.4 mL/cm²) de medio de cultivo McCoy 5A o DMEM que contenían rojo de fenol y suplementados con suero fetal bovino (SFB) descomplementado al 10 % (v/v), penicilina (10,000 U/mL) - estreptomicina (10 mg/mL) al 1 % y gentamicina 1 % (5 µg/mL), en incubación a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad del 95 %, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La individualización celular se realizó lavándose el tapiz celular con 10 mL de solución Hank's 1X, para desprender posteriormente las células con tripsina-EDTA 1X por 15 min a 37 °C. A continuación, la tripsina se inactivó con medio de cultivo y las células se empastillaron por centrifugación a 2,000 rpm por 10 min a 4 °C. Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripán (0.05 %) en cámara de Neubauer. Los cultivos se mantuvieron con el apoyo del M. en C. Carlos Osorio-Trujillo del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

8.2.6 Efecto de RHTR sobre líneas celulares.

La actividad de RHTR en las líneas celulares SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B se analizó con curvas de viabilidad dosis-respuesta con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), el cual es reducido a formazán por células viables [Mosmann, 1983; Ampasavate y cols., 2010; Dutra y cols., 2012]. Con este propósito, se sembraron 2×10^4 células en una placa de 96 pocillos con fondo plano (Corning®) y 200 µL de medio de cultivo suplementado durante 24 h, en las condiciones mencionadas anteriormente. Una vez que se observaron las células adherentes, se añadieron concentraciones que variaron de 1 y 1000 µg/mL a cada pocillo de EA, FA02, principios activos de RHTR, así como de paclitaxel, PBS 1X y DMSO al 10 %. Las placas se incubaron durante 24 h, añadiéndose 20 µL de MTT (5 mg/mL en PBS 1X) 4 h antes de finalizar los ensayos. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado y el formazán producido, se disolvió en

200 µL de 2-propanol frío, el cual se acidificó con HCl al 0.1 % y se cuantificó en un espectrofotómetro VariosKan® a 590 nm. Finalmente, la viabilidad celular fue determinada con la fórmula descrita a continuación y la concentración inhibitoria del 50 % (CI₅₀), mediante un análisis de regresión lineal (porcentaje sobrevivencia vs log concentración). La actividad citotóxica se consideró alta IC₅₀ ≤ 30 µg/mL, media 31-70 µg/mL y baja 71-100 µg/mL [Suffness y Pezzuto, 1990].

Se realizó la estimación de la dosis letal del 50 % (DL₅₀) en líneas celulares normales (para obtener una aproximación acerca de la toxicidad aguda de RHTR e identificar una concentración terapéutica segura) y el índice de selectividad (IS) [Moo-Puc y cols., 2009; Halle, 2003]. Las fórmulas utilizadas en este estudio fueron:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Abs células sin tratamiento} / \text{Abs células con tratamiento}) * 100$$

$$DL_{50} \text{ (mg/kg)} = 10^x [(0.372 * \log CI_{50}) + 2.024]$$

$$IS = CI_{50} \text{ línea celular normal} / CI_{50} \text{ línea celular de cáncer}$$

8.2.6.1 Ensayo cometa.

Para determinar la actividad genotóxica de RHTR, se evaluaron el AE y la FA02 en la línea celular CHO-K1, con el método de electroforesis en gel unicelular [Costa-Rodrigues y cols., 2014; Dhawan y cols., 2003]. Para ello, se sembraron 5 x 10⁴ células por pocillo en una placa de 24 pozos (Corning®) con 2 ml de medio McCoy 5A suplementado, en las condiciones mencionadas anteriormente. Las células adherentes, se trataron con CI₅₀ de muestras y controles (H₂O₂ al 0.3 % y vehículo PBS 1X) durante 24 h. Finalizada la interacción, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con PBS 1X para despegarlas por tripsinización. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación (2,000 rpm, 10 min a 4 °C) para decantar el sobrenadante y añadir 50 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % a 37 °C y extenderlas rápidamente sobre portaobjetos recubiertos con agarosa de fusión normal al 0.5 %. Ambos polímeros se prepararon en TAE 1X (40 mM de Tris-base, ácido acético 1 % y 1 mM de EDTA, pH 8.5) y SYTOX® green (5 mM, Thermofisher®) para la tinción de ácidos nucleicos a una dilución 1:5000 (v/v). Los portaobjetos se cubrieron y se dejaron gelificar a 4 °C durante 20 min. Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos suavemente para sumergir los

portaobjetos en una solución fría de lisis celular de membranas (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris-base 10 mM, DMSO al 10 % y Tritón X-100 al 1 %, pH 10) durante 1 h a 4 °C en ausencia de luz. Las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (1 mM EDTA y 300 mM NaOH, pH 13) durante 30 min a 4 °C en la oscuridad antes del procedimiento, para permitir el desenrollamiento del ADN y a continuación se llevó a cabo la electroforesis durante 20 min a 25 V y 300 mA, en las mismas condiciones. Posteriormente, las placas se sumergieron en tampón de neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) durante 15 min a temperatura ambiente y se fijaron con 2 mL de EtOH durante 10 min en oscuridad. Finalmente, las preparaciones se montaron con Vectashield®/DAPI (Vector Laboratories®) y se analizaron mediante microscopía confocal (LSM 700, Zeiss®) a 10X con el software ZEN 2011 (versión 1.0, Zeiss®). Finalmente, se midió la longitud de la migración del ADN dañado y se agruparon en intervalos de 25 µm para ser analizados estadísticamente con la prueba de rangos múltiples de Tukey.

8.2.6.2 Evaluación de la morfología y muerte celular.

Se analizó el efecto de RHTR en la morfología y muerte celular de las líneas mediante tinción rápida Hemacolor® y el ensayo TUNEL. Con este fin, el protocolo de cultivo celular fue similar al descrito anteriormente y se llevó a cabo con 3×10^4 células por pocillo y 400 µL de medio suplementado en portaobjetos con cámara Lab-Tek™ (Thermoscientific™). Posteriormente, las células adherentes se trataron con CI_{50} de extractos, compuestos y controles durante 24 h. Finalizado el tiempo, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 30 min a 37 °C. Concluida la fijación, las células se lavaron repetidamente y se llevó a cabo la tinción directa de las células. La presencia de apoptosis en las células se determinó usando el ensayo TUNEL con el kit Apo-BrdU™ (Invitrogen™) que mide la fragmentación del ADN "*in situ*" de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al finalizar ambas tinciones, los portaobjetos se montaron con VectaShield®/DAPI (Vector Laboratories®) o resina Entellan® (Merck®) y se analizaron mediante microscopía óptica (BX41, Olympus®) o confocal (LSM 700, Zeiss®)

a 40X. Finalmente, las imágenes fueron analizadas en el software Image-Pro Plus (versión 4.0, Media Cybernetics©) y ZEN 2011 (versión 1.0, Zeiss®).

8.2.7 Ratones desnudos (*Mus musculus*, *Nu/Nu*) como modelo de estudio experimental *in vivo*.

Para confirmar el efecto terapéutico de los extractos y principios activos de RHTR, se llevaron a cabo ensayos de actividad antineoplásica con ratones inmunodeficientes (*nude-mice*), los cuales fueron xenotrasplantados con células SKOV-3. Este modelo animal presenta una mutación espontánea simple denominada *nude* (*Nu*). Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11. Se aisló por primera vez en 1966 en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio de Glasgow, Escocia. Carecen de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechaza tejidos alo y xenotrasplantados [Carbone y Maschi, 2006]. Presentan un complemento normal de linfocitos B dependientes de la médula ósea. En ocasiones presentan escasos folículos pilosos normales y algunos pelos finos (Figura 9). Existen varios genes mutantes que producen el fenotipo desnudo: *nude*, *naked*, *hairless*, *rhino*, etc.; estos no deben confundirse uno con el otro, por lo cual ratón *nude* y ratón sin pelo no debe de usarse indistintamente [Carbone y Maschi, 2006]. Otras cepas de roedores inmunosuprimidos son (*Swiss +/nu* y *BALB/c A-nude*) [Nieves, 2001]. En ratones de fenotipo común, se puede inducir una inmunosupresión química administrando una dosis oral o intragástrica de 200 µg de dexametasona (glucocorticoide) cada 24 h por un periodo de 4 semanas.

8.2.7.1 Cuidado y mantenimiento de los ratones *Nu/Nu*.

En este estudio se utilizaron ratones hembras *Nu/Nu* (Figura 9) con un peso corporal de 25 ± 5 g, sexualmente maduros y de 6-8 semanas de edad, los cuales se alojaron en compartimientos estériles con ventilación artificial y temperatura controlada (25 ± 1 °C), con ciclos alternos de luz/oscuridad por 12 h. Se alimentaron con dieta estándar para ratón de laboratorio estéril (LabDiet®) y el acceso al agua de bebida fue *ad libitum*. Se mantuvieron en la Unidad de Producción y Experimentación Animal de Laboratorio

(UPEAL). Pasaron por un periodo de adaptación de 15 días en las condiciones del laboratorio, antes de comenzar los procedimientos experimentales. Transcurrida la cuarentena, los animales se distribuyeron en los diferentes grupos de estudio de acuerdo con sus pesos corporales. El alimento les fue retirado 12 h antes de los tratamientos o la toma de muestras, pero se continuó el suministro de agua.

El protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (No.184-16, Anexo 1), según los alineamientos establecidos por el PICUAL y la NOM-062-ZOO-1999 [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001].



Figura 9. Modelo de ratón inmunodeficiente *nude-mice* (*mus musculus*, *Nu/Nu*). El modelo animal presenta una mutación simple *nude* (*Nu*) en el cromosoma 11, el cual es un alelo mutante recesivo perteneciente al grupo *linkage VII* que provoca un desarrollo deficiente del timo y por tanto una supresión del sistema inmunológico.

8.2.8 Estudio del efecto antineoplásico de RHTR.

Para estudiar el efecto antineoplásico de RHTR, se emplearon 40 ratones hembra *Nu/Nu* de 60 días de edad (≈ 6 semanas), distribuidos aleatoriamente en grupos de 5 individuos ($n=5$) y criados bajo las condiciones descritas anteriormente. A continuación, fueron xenotrasplantados subcutáneamente en el flanco derecho con 5×10^6 células de cáncer ovárico humano SKOV-3, suspendidas en 100 μL de PBS 1X [Zou y cols., 2007]. Se monitoreó el desarrollo de la lesión tumoral durante 28 días hasta observarse palpable y presentar un volumen de $\approx 50 \text{ mm}^3$, antes de proceder a la administración de los tratamientos. A la cuarta semana, los roedores se trataron intraperitonealmente (i.p.) con

200 mg/kg/día de EA y FA02 durante 28 días. En el caso de la evaluación de principios activos, se realizó la administración vía peritumoral de ácido gálico y miricetina a 50 mg/kg durante el mismo periodo, evitándose perturbar la masa tumoral o lesionar algún capilar cercano. En ambos casos, se utilizaron como controles carboplatino, paclitaxel y vehículo. Los procedimientos se seleccionaron con base en los nuevos tratamientos farmacológicos para el cáncer ovárico [Wright y cols., 2015]. En la Tabla 5, se presenta el esquema de tratamiento utilizado para el estudio.

Tabla 5. Esquema de tratamientos utilizados en el estudio de la actividad antineoplásica de RHTR.

Grupo	Tratamiento	Vía administración	Dosis/Tiempo
I	EA	Intraperitoneal	200 mg/kg/día
II	FA02	Intraperitoneal	200 mg/kg/día
III	Carboplatino	Intraperitoneal	50 mg/kg (3 días alternos/semana)
IV	Vehículo (PBS 1X)	Intraperitoneal	100 µL/día
V	Ácido gálico	Peritumoral	50 mg/kg (2 días alternos/semana)
VI	Miricetina	Peritumoral	50 mg/kg (2 días alternos/semana)
VII	Paclitaxel	Peritumoral	3 mg/kg (2 días alternos/semana)
VIII	Vehículo (DMSO al 10 %)	Peritumoral	20 µL (2 días alternos/semana)

En la tabla, se indica: (EA) extracto acuoso, (FA02) fracción acuosa 02, la cual fue obtenida por fraccionamiento del EA de RHTR en fase sólida con disolventes (apartado 8.2.2).

El peso de los roedores se determinó constantemente mediante una báscula electrónica Ohaus® CS200 y las lesiones tumorales se evaluaron cada semana con un calibrador Vernier, tomando en cuenta tamaño y morfología, antes de la administración de los tratamientos. Los ensayos finalizaron antes de que los tumores alcanzaran los puntos límites establecidos por el Consejo Mexicano de Protección Animal. El volumen tumoral se determinó con la siguiente fórmula [Herrera-Martínez y cols., 2016]:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = [\text{Longitud} * (\text{Amplitud})^2] / 2$$

8.2.8.1 Estudios imagenológicos del efecto antineoplásico.

Al finalizar los 28 días de tratamiento, los ratones se anestesiaron por inyección i.p. con 250 µL de pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL) diluido 1:10 (v/v) con PBS 1X. Posterior

mente, se realizaron los estudios de imagen, los cuales consistieron en 20 TAC y RMN simples (de cuerpo completo con dirección craneocaudal), así como 40 USG. Con este fin, se colocaron los ratones en decúbito supino en los diferentes equipos y se llevaron a cabo los siguientes protocolos:

8.2.8.1.1 Tomografía axial computarizada (TAC).

Se realizó en un equipo Somatom Emotion™, DURA 422 MV *high performance CT X-ray tube* con detector *ultra fast ceramic* (Siemens™ *Medical Solutions*, Alemania). El protocolo se llevó a cabo sin medio de contraste e incluyó las siguientes secuencias y parámetros: topograma: 20 mA, 80 KV, con una duración de 2.15 s, cortes a 0.6 mm y longitud de 128 mm. Con un protocolo de ExtrHR, con 30 mAs efec, 80 Kv, con cortes a 0.6 mm; reconstrucciones con un corte de 0,6 mm, con ventana *Extremity*, filtro B40s medio; incremento de reconstrucción de 0.3 mm.

8.2.8.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Se realizó en un equipo Magnetom Symphony™, A Tim System 1.5T eco (Siemens™ *Medical Solutions*, Alemania), con antena de rodilla sin contraste paramagnético en las siguientes secuencias y parámetros: proyecciones coronales T1 (grosor de corte, 4 mm; TR/TE, 518 ms/13 ms; campo de visión [FOV], 200 mm; matriz 512); T2 (grosor de corte, 2 mm; TR/TE, 3890 ms/117 ms; FOV, 180 mm; matriz 512) y STIR (grosor de corte, 3 mm; TR/TE/TI, 5000 ms/29 ms/ 130 ms; campo de visión [FOV], 153 mm; matriz 512).

8.2.8.1.3 Ultrasonografía (USG).

Se realizó en un ecógrafo LogiQ™ P7 con *Agile Acoustic Architecture* (General Electric-Healthcare, Reino Unido) en imagen y tiempo real con transductor lineal multifrecuencia para partes blandas y vasculares L6-12 RS (banda 4-13 Mhz y visión de 39 mm), con *preset* de músculo esquelético, aplicación *Doppler color* y *power*.

Una vez concluidos los estudios de imagen, los resultados se analizaron en el programa RadiAnt DICOM Viewer (versión 3.4, Medixant©), para realizar la medición y la

caracterización de las lesiones tumorales, así como las reconstrucciones 3D. Los estudios se realizaron con la colaboración del Médico Radiólogo Rodrigo Daniel Castellanos Mijangos del Servicio de Imagenología en el Centro Médico ISSEMyM “Arturo Montiel Rojas”.

8.2.8.2 Determinación de parámetros bioquímicos y hematológicos.

Los ratones se mantuvieron en ayuno después de terminar los estudios de imagen, pero se continuó el suministro de agua *ad libitum* hasta la obtención de sangre periférica total. Con este fin, las muestras de sangre se tomaron mediante punción retro-orbital en ratones anestesiados y sin permitir la fibrilación cardíaca, con un tubo capilar (1.2 mm diámetro interno) y tubos BD Microtainer® con K₂EDTA para el recuento celular o sin anticoagulante para la obtención de suero (centrifugación a 3,500 rpm, 4 °C, 10 min), para las determinaciones bioquímicas. La biometría hemática se realizó en un citómetro de flujo para hematología, Mindray® BC-2300 y los parámetros bioquímicos con pruebas de diagnóstico estándar (Human® kits) en el sistema médico automatizado Prestige® 24i (Tokyo Boeki®). Los estudios se realizaron con la colaboración de la M. en C. Pilar Hernández Rodríguez de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH.

8.2.8.3 Evaluación anatómica.

Después de inducir la anestesia profunda, los ratones fueron sacrificados por fractura cervical y montados en una tablilla de disección para realizar la necropsia correspondiente. Para ello, se practicó una laparotomía media completa, realizándose una incisión en la superficie ventral del abdomen con tijeras quirúrgicas y abatiéndose la pared abdominal con dos secciones horizontales, inmediatamente por debajo de los bordes costales inferiores. Se seccionó el diafragma y se traccionó la pared costal, fijándola con una pinza para permitir el acceso al tórax y exponer el contenido de ambas cavidades. Finalmente, se realizó la identificación y la extracción de las lesiones tumorales, así como de pulmones, bazo, corazón, hígado y riñones. El tejido adherente en los órganos se retiró con una hoja de bisturí No. 11 y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, los órganos se dejaron secar sobre papel filtro antes de ser pesados y

se determinó el porcentaje de peso relativo (% PR) mediante la siguiente fórmula [Akindede y cols., 2014]:

$$\% PR = [(peso\ del\ \acute{o}rgano / peso\ corporal\ del\ rat\acute{o}n) * 100]$$

Finalmente, se midieron las dimensiones de los 6rganos y del tumor extra6idos, con un calibrador Vernier digital Truper® y se realiz6 un registro fotogr6fico con una c6mara digital r6flex Nikon® D40 (objetivo de 18-55 mm), antes de preservarse por fijaci6n para la obtenci6n de cortes histol6gicos.

8.2.8.4 Evaluaci6n histopatol6gica.

Los 6rganos seleccionados se fijaron con paraformaldeh6do al 4 % durante 24 h a 4 6C en oscuridad. Posteriormente, se llev6 a cabo un aclaramiento por deshidrataci6n en el procesador de tejidos (Autotechnicon®, modelo 2A) durante 12 h, con las siguientes soluciones: Formol (2 veces), EtOH al 96 % (5 veces), EtOH absoluto, xilol (2 veces) para finalmente bloquear con parafina a 90 6C. A continuaci6n, los tejidos se colocaron en un molde de inclusi6n con parafina de bajo punto de fusi6n y un casete de histolog6a para formar un bloque. Subsecuentemente, se realizaron cortes de 5 μm de espesor con una navaja semifina en un micr6tomo rotatorio (Leica®, RM2125 RTS). Las secciones cortadas se colocaron en un ba6o de flotaci6n a 52 6C (Leica®, HI1210) para ser montadas sobre portaobjetos, que se desparafinaron en un horno a 86 6C durante 8 min. Finalmente, las muestras se ti6nieron con hematoxilina-eosina para realizar observaciones en b6squeda de lesiones patol6gicas con un microscopio Olympus® BX41 y objetivos de 10X/40X, en el software Image-Pro Plus (versi6n 4.0, Media Cybernetics®). El ensayo se realiz6 con la colaboraci6n del M6dico Pat6logo Ernesto Ramos Mart6nez del Servicio de Anatom6a Patol6gica del Hospital CIMA y de la Q.B.P. Ivette Stephanie Rodr6guez Reyna.

En el caso de las lesiones tumorales, 6stas se dividieron en tres secciones para ser preservadas en paraformaldeh6do al 4 % (siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente), glutaraldeh6do al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.2) durante 24 h a 25 6C en oscuridad, para microscop6a electr6nica de transmisi6n (MET) (apartado 8.2.8.4.2) y finalmente, en *tissue freezing m6dium*® (Jung, Leica®) a -196 6C en nitr6geno.

8.2.8.4.1 Tinción con hematoxilina-eosina (HyE).

Posterior a la fijación de los tejidos, se llevó a cabo la tinción con HyE, hidratándose las preparaciones con 3 lavados de xilol por 8 min para retirar los residuos de la solución fijadora y se continuó con la inmersión en EtOH absoluto y al 96 % (20 veces), para concluir con H₂O destilada (20 veces). Posteriormente, se sumergieron en la solución de hematoxilina alumínica de Harris (HyCEL™) por 5 min y para eliminar el exceso de colorante, se realizaron lavados con H₂O destilada (20 veces). Para llevar a cabo el viraje del colorante, se utilizó H₂O amoniacal (NH₄) al 1 % por 1 s y el exceso de la solución se retiró con H₂O destilada y EtOH al 96 % (20 veces). A continuación, las preparaciones se colocaron en eosina (J.T.Baker®) 1 min y se realizaron deshidrataciones con EtOH al 96 % y absoluto (20 veces). Finalmente, las preparaciones fueron aclaradas con xilol (20 veces) para ser montadas en resina sintética Entellan® (Merck®) y ser observadas por microscopia óptica (Olympus® BX41) a 10X/40X, con el software Image-Pro Plus (versión 4.0, Media Cybernetics©) [Montalvo, 2010].

8.2.8.4.2 Morfología ultra-estructural de tumores SKOV-3.

Finalizado el tiempo de fijación, los tumores se lavaron 2 veces con cacodilato de sodio (C₂H₆AsNaO₂) 0.1 M a pH 7.2 y posteriormente se post-fijaron con tetraóxido de osmio (O₅O₄) al 1 % en C₂H₆AsNaO₂ 0.1 M (v/v) por 1 h a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron nuevamente con C₂H₆AsNaO₂ 0.1 M y se deshidrataron mediante la inmersión secuencial en soluciones crecientes de EtOH y óxido de propileno (C₃H₆O) (50, 70, 90, 100 % EtOH y 100 % C₃H₆O, v/v) durante 10 min a 4 °C. La inclusión de los tumores se llevó a cabo con resina epóxica Poly/Bed® 812 (Polysciences®) y óxido de propileno (1:1, v/v) durante 12 h y (2:1, v/v) por 1 h a temperatura ambiente, para finalizar la polimerización con resina epóxica a 60 °C por 24 h. Finalmente, se realizaron cortes semifinos de 0.5 µm y ultrafinos de 60 nm de espesor con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo (SORVALL®, Porter-Blum MT-1). Los primeros cortes se tiñeron por calor con azul de toluidina (ATO) al 2 % y Na₂CO₃ al 1 % (1:1, v/v) a 90 °C y los últimos se montaron en rejillas de cobre para ser contrastados con acetato de uranilo al 2 % por 20 min y citrato de plomo al 0.2 % durante 5 min. La observación de las

preparaciones se llevó a cabo en un microscopio óptico Olympus® BX41 a 60X y en un microscopio electrónico de transmisión Jeol™ JEM-1100. El ensayo se realizó con el apoyo de la D.C. Bibiana Chávez Munguía y la Biol. Anel Edith Lagunes Guillén del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

8.2.9 Evaluación del efecto citológico de principios activos de RHTR en SKOV-3.

8.2.9.1 Generación de ERO intracelular por H₂-DCF-DA.

El estrés oxidativo es producido por un desequilibrio en la generación de ERO, los cuales son capaces de producir la oxidación de moléculas biológicas como el ADN y desencadenar la muerte celular.

La producción de ERO intracelular, se determinó mediante la sonda Diacetato de 2',7'-dihidrodiclorofluoresceína (H₂-DCF-DA) en células SKOV-3, las cuales fueron tratadas con los principios activos de RHTR. Con este fin, se cultivaron 2 x 10⁴ células en una placa negra de 96 pocillos con fondo plano (Corning®) y 200 µL de medio de cultivo suplementado durante 24 h, según las condiciones mencionadas en el apartado 8.2.6. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con la CI₅₀ de ácido gálico y miricetina, así como H₂O₂ al 0.1 % y vehículo (DMSO:PBS 1X, 1:10 v/v) por 24 h a 37 °C. A continuación, las células se incubaron con 25 µM de H₂-DCF-DA (Sigma®) durante 15 min a 37 °C en oscuridad, antes de finalizar el ensayo. Finalmente, la fluorescencia se cuantificó en un espectrofotómetro FluorosKan® Ascen FL (Termoscientific™) a 488/529 nm [Herrera-Martínez y cols., 2016]. La intensidad de la emisión fluorescente indica mayor o menor presencia de ERO en el interior de la célula.

8.2.9.2 Determinación de la muerte celular por AnV/IP.

Se llevó a cabo la evaluación de la muerte celular inducida en SKOV-3, con los principios activos de RHTR y la tinción de Anexina-V/Ioduro de propidio (AnV/IP). La tinción es capaz de detectar células apoptóticas, ya que la proteína AnV posee una gran afinidad por la fosfatidilserina que se transloca desde la parte citosólica de la membrana celular hacia la superficie en dicho proceso; mientras el IP se internaliza para intercalarse

con el ADN, únicamente en células que presentan una alteración o daño en la membrana plasmática.

Con este fin, se cultivaron 2×10^4 células/pozo en una placa negra de 96 pocillos con fondo plano (Corning®) y 200 μ L de medio de cultivo suplementado durante 24 h. Una vez adheridas las células, se añadieron los tratamientos con ácido gálico y miricetina, así como controles (paclitaxel y vehículo, DMSO:PBS 1X, 1:10 v/v), con la CI_{50} determinada previamente en los ensayos de viabilidad. La placa se incubó durante 24 h y finalizado el tiempo, se retiró el medio de cultivo para añadir 200 μ L de tampón de unión 1X (10 mM HEPES, 140 mM NaCl y 2.5 mM $CaCl_2$ a pH 7.4), 2 μ L de AnV-FITC e IP (250 μ g/mL) (BioVision™) por 15 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia se cuantificó en un espectrofotómetro FluorosKan® Ascen FL (Thermoscientific™) a 485/538 nm para AnV y 538/620 nm para IP. Las células se identificaron como viables (AnV-/IP-), necróticas (AnV-/IP+), en apoptosis temprana (AnV+/IP-) y tardía (AnV+/IP+).

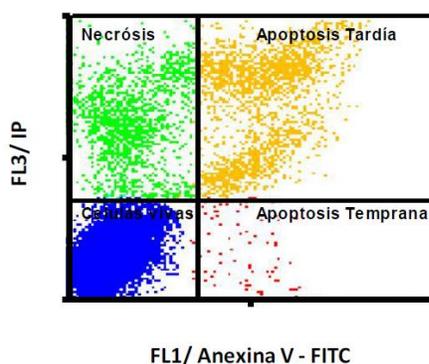


Figura 10. Análisis de células apoptóticas por AnV/IP por citometría de flujo.

8.2.9.3 Efecto de los principios activos de RHTR en la red de microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto celular por inmunohistofluorescencia (IHF).

Se analizó la interacción de los principios activos de RHTR, con las proteínas actina y tubulina que conforman el citoesqueleto celular de SKOV-3. Con este propósito, se colocaron cultivos celulares en portaobjetos con cámara Lab-Tek™ (Thermoscientific™) empleándose 3×10^4 células/pozo con 400 μ L de medio de cultivo suplementado e incubándose a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con la CI_{50} de

ácido gálico, miricetina, paclitaxel y vehículo (DMSO:PBS 1X, 1:10 v/v) por 24 h, para observar el reacomodo celular derivado del tratamiento. Finalizada la interacción, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 30 min a 37 °C. A continuación, se retiró la solución fijadora y las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min, para ser permeabilizadas posteriormente con Triton-X100 al 0.2 % en PBS 1X durante 15 min. Para bloquear las células, se utilizó SFB al 10 % en PBS 1X durante 1 h a 37 °C y finalmente, se realizaron lavados repetidos con PBS 1X para eliminar los residuos derivados del procesamiento. La tubulina se marcó con un anticuerpo policlonal primario α/β -tubulina (55 kDa, conejo) (1:200 μ L, v/v) (Cell Signaling, No. 2148) durante 12 h a 4 °C y el anticuerpo secundario IgG acoplado a FITC (burro, anti-conejo) (1:100 μ L, v/v) (Jackson Immuno Research®, No. 711-095-152) durante 1 h a 37 °C. Adicionalmente, la actina filamentosa se marcó con faloidina-rodaminada (2:100 μ L, v/v) (ThermoFisher™, No. R415) por 30 min a 25 °C en ausencia de luz. Concluidos los tiempos, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS 1X durante 5 min, para desprender los pozos de la cámara y dejar secar a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se montaron con VectaShield®/DAPI (Vector Laboratories®) para ser observadas en un microscopio confocal Zeiss® LSM 700 AxioObserver a 40X de aumento y el software ZEN® 2011 (Versión 1.0, Zeiss®). El ensayo se realizó con la colaboración de la D.C. Verónica Ivonne Hernández Ramírez del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

8.2.9.4 Análisis del ciclo celular por IP.

Se llevó a cabo el análisis del ciclo celular en SKOV-3, posterior al tratamiento con los principios activos de RHTR, empleándose la tinción con Ioduro de propidio (IP) el cual es un colorante que se une específicamente al ADN de doble cadena y permite cuantificarlo en cada una de las fases del ciclo celular ($G_0/G_1:2n$, $S:2/4n$ y $G_2/M:4n$).

Para ello, se realizaron cultivos con 2×10^5 células por tratamiento, sembrándose 5×10^4 células/pozo en una placa de 24 pocillos de fondo plano (Corning®) y 2 mL de medio de cultivo suplementado durante 24 h. Las células adheridas, se trataron con la Cl_{25} de ácido gálico, miricetina, así como los controles de paclitaxel (5 μ g/mL), mitomicina (20

$\mu\text{g/mL}$) y vehículo (DMSO:PBS 1X, 1:10 v/v) por 24 h. Finalizada la interacción, las células se despegaron con tripsina-EDTA y se empastillaron por centrifugación (apartado 8.2.5.4). Posteriormente, las células se fijaron y se permeabilizaron con EtOH frío al 70 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h. Finalmente, se realizó un lavado y empastillado celular por centrifugación (2,000 rpm, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para adicionar 400 μL de PBS 1X, 10 μL RNAsa A (10 mg/mL) y 20 μL de IP (1 mg/mL) durante 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Finalmente, las muestras se analizaron por citometría de flujo en un BD FACS-Calibur™ (Becton Dickinson®) a 620 nm y el contenido relativo de ADN celular se determinó en 2×10^4 eventos para cada fase del ciclo celular en el programa ModFit LT (versión 5.0, Verity Software House®).

La apoptosis celular se identificó como una población de ADN sub-diploide (Sub- G_1), con base en la dispersión directa de la luz y la fluorescencia del IP. El ensayo se realizó con la colaboración del M. en C. Víctor Hugo Rosales García del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV.

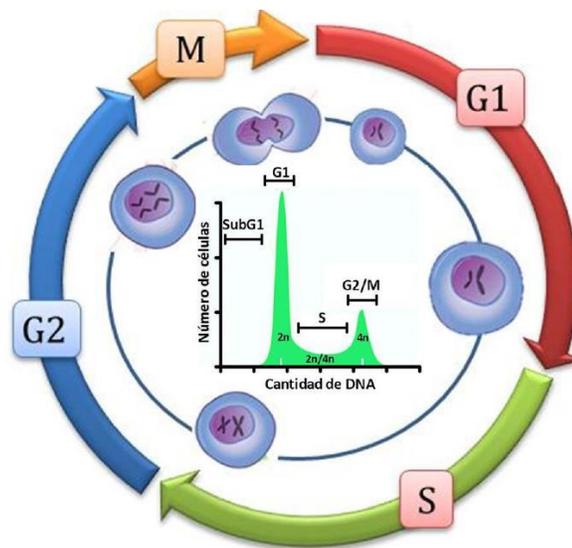


Figura 11. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. (FUENTE: Guevara-Rozo, 2012).

9. RESULTADOS.

9.1 Recolección e identificación de RHTR.

La recolección de tallos de RHTR, se realizó en el "Cerro Pelón", municipio de Namiquipa en Chihuahua, México (Figura 12). Se llevó a cabo durante el mes de mayo en primavera, según el uso popular de la planta. Algunas de las características encontradas en RHTR que permitieron su identificación, fueron: la presencia de hojas trifoliadas, pinnaticompuestas, de bordes aserrados y evidentemente hendidas, que cambian su coloración a tonos rojizos, así como la presencia de frutos pequeños, esféricos, carnosos, anaranjados, con un sabor amargo peculiar (Figura 13) [Rose, 2005; Shaw y Debolt, 2004]. Las características mencionadas, corresponden a las encontradas en línea en el herbario G.B. Hinton (No. 18713) de "Irekaní", propiedad de la Unidad de Informática para la Biodiversidad del Instituto de Biología de la UNAM [UNIBIO, 2008] y a las descritas en el herbario virtual de CONABIO (No. K000081429), en donde se puede apreciar las similitudes en la forma y la disposición de las hojas y de los frutos [CONABIO, 2009]. La identificación de los especímenes recolectados, la llevó a cabo el D.C. Toutcha Lebgue Keleng de FZE-UACH, mientras un ejemplar completo con hojas, flores y frutos fue preservado por deshidratación en una prensa, para ser incorporado al herbario de la ENCB-IPN y del ICBM (Registro No. 1543), quienes finalmente dieron validez a la identificación de las muestras obtenidas.

9.2 Análisis por UPLC y GC.

En RHTR, se encontraron 272 compuestos y se identificaron putativamente 200 por UPLC-MS^E (Apéndice 1), mientras por GC-MS se detectaron 50 compuestos de naturaleza volátil y únicamente 13 fueron identificados (Tabla 7), utilizándose la librería de la plataforma NIST (Apéndice 2). Los cromatogramas de iones totales (TICs) (Figura 14A) y los perfiles cromatográficos a 280 nm (Figura 15) del EA y el EM por UPLC, no mostraron diferencias en la composición fitoquímica con excepción en la abundancia relativa de compuestos, ya que el EM presentó una mayor cantidad en comparación con el EA; de igual manera el perfil de TIC para ambos extractos presentó una similitud del

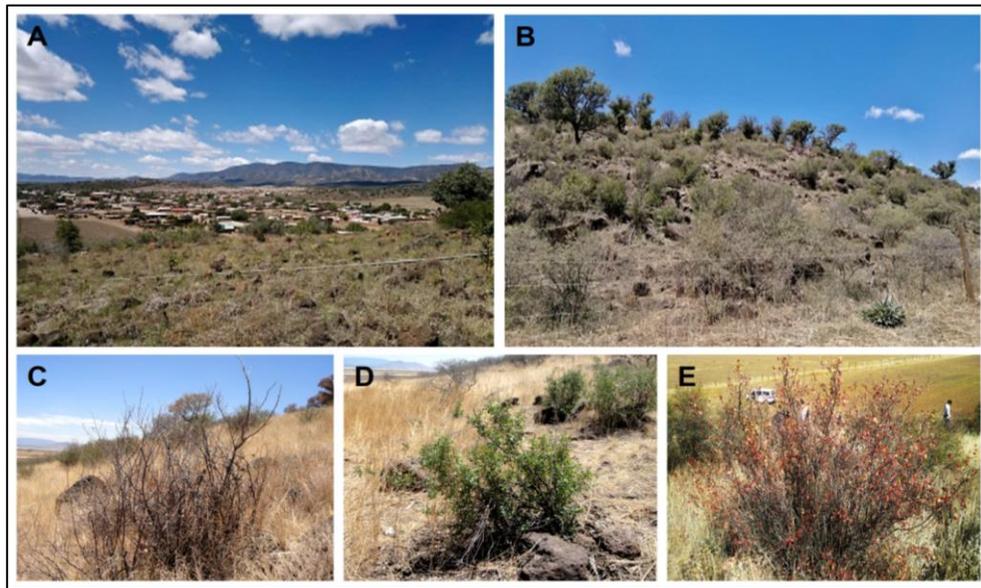


Figura 12. Características de la zona de recolección de RHTR. La zona es una llanura aluvial con lomeríos, cercana a bosques de pino, encino y táscate, de clima semiseco templado y suelo somero-pedregoso. Los especímenes se observaron carentes de floración. En las fotografías se puede observar: (A), Comunidad Colonia Independencia en Namiquipa, Chihuahua, México (mapa topográfico del INEGI: H13C42 y coordenadas geográficas GPS: 29°5'59'N, 107°32'33'O a 1,960 msnm). (B), El "Cerro Pelón" en Colonia Independencia. (C y D), arbustos con y sin hojas durante la estación de primavera en mayo del 2014. (E), arbustos con hojas verdes y rojizas, así como frutos en la estación de otoño en noviembre del 2014. (Fotografías por L. Varela-Rodríguez).

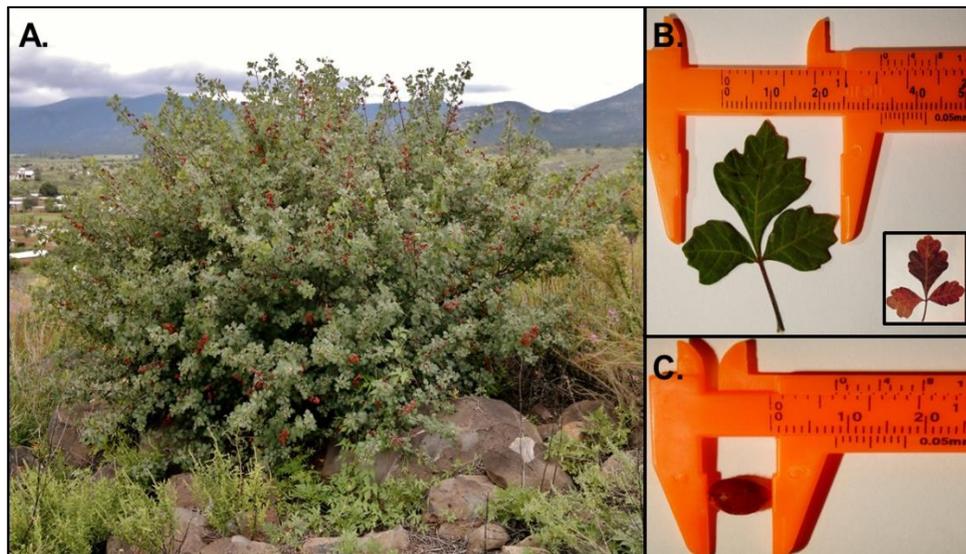


Figura 13. Características morfológicas de RHTR. En las fotografías se observa: (A), la presencia de hojas trifoliadas, pinnaticompuestas, de bordes aserrados y evidentemente hendidas. (B), cambio de coloración en las hojas de verde a tonos rojizos durante la estación de otoño. (C), la presencia de frutos pequeños, esféricos, carnosos y de color anaranjado. (Fotografías por L. Varela-Rodríguez).

98.9 % como se muestra en su alineación (Figura 14A). Los principales compuestos en RHTR fueron los flavonoides (29 %), seguidos por ácidos grasos (22 %), ácidos fenólicos (11 %) y compuestos glucosídicos (10 %). En la Tabla 6 se encuentran los compuestos más abundantes en RHTR, que fueron: el α -D-galactosil-(1 \rightarrow 3)-1D-mio-inositol, el 1,2,3,4,6-pentakis-O-galoil- β -D-glucosa (β -PGG) y el ácido margárico, entre otros fitocompuestos; los cuales presentan diversas actividades en las plantas como metabolitos primarios y secundarios.

Un análisis del perfil cromatográfico de la fracción activa FA02 (Figura 16), mostró una abundancia de los siguientes compuestos: miricetina, quercetina, quercitrina, miricetina 3-(4"-galoilramnosido), fisetina y amentoflavona (Tabla 6), los cuales fueron identificados por su patrón de fragmentación (Apéndice 3). Adicionalmente, un análisis de las fracciones en conjunto reveló que la miricetina se encuentra presente en todas ellas, a un tiempo de retención de 8.27 min y con mayor abundancia en la FA02 (Figura 16). La miricetina, es un compuesto que ha sido reportado en el género *Rhus* y el cual presenta actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer [Rayne y Mazza, 2007]. Por lo cual, puede estar relacionada con la actividad antineoplásica observada en este estudio y las propiedades medicinales de RHTR.

Se ha reportado que el ácido gálico y el etil galato se encuentran entre los principios activos de RHTR [Pettit y cols., 1974]. El ácido gálico se identificó a 8.52 min de retención (Tabla 6), mientras el etil galato no se encontró. Sin embargo, el metil galato se detectó a 6.44 min (Tabla 6), posiblemente debido al proceso de extracción de compuestos utilizado en el estudio. La presencia de galatos en RHTR, se deriva de reacciones catabólicas del β -PGG, el cual probablemente es utilizado por la planta para elaborar nuevos metabolitos secundarios contra diferentes factores estresores [Shin y cols., 2017; Gross, 1992].

En los *TICs* por GC (Figura 14B), se observaron diferencias entre la composición fitoquímica del EH y el EM, lográndose identificar putativamente al (*E,E*)-2,4-nonadienal a los 10.57 min, como el principal compuesto del EH; mientras la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4*H*-piran-4-ona (DDMP) a 12.88 min fue para el EM (Tabla 7). Ambos compuestos han sido reportados con actividad antibacteriana por otros autores [Cansu y cols., 2013].

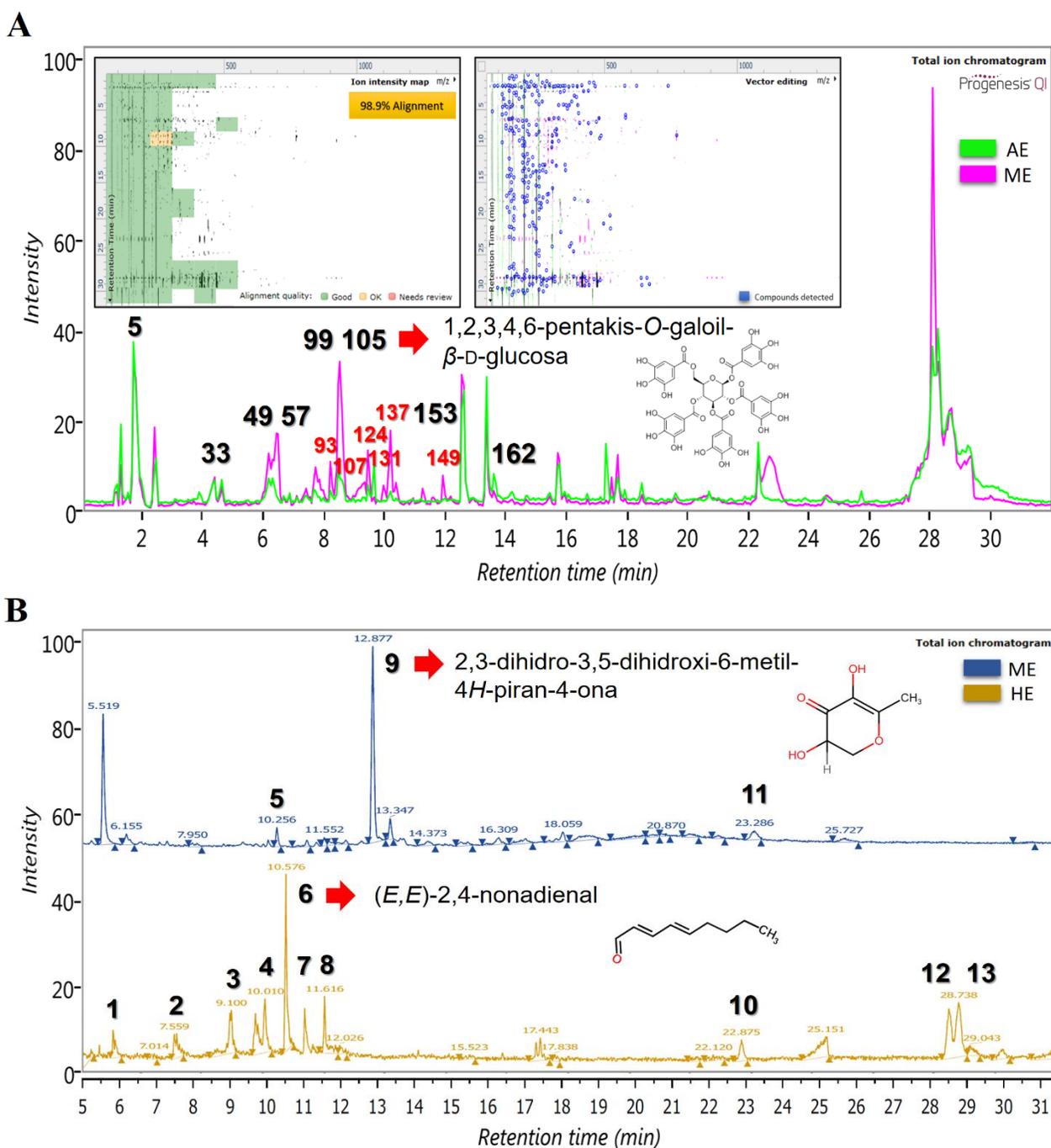


Figura 14. TICs por UPL C-MS^E y GC-MS con el perfil fitoquímico de RHTR. En la figura se observa: (A), TIC por ESI+ de EA y EM que muestra la composición fitoquímica de los extractos, sin observarse diferencias entre ambos; el mapa de intensidad iónica marca 98.9 % de alineación y el mapa de vectores señala 200 identificaciones putativas de 272 compuestos encontrados en RHTR. (B), TIC por EI+ de EM y EH con 13 identificaciones putativas de 50 compuestos encontrados en RHTR. Los compuestos más importantes fueron señalados y los más abundantes en EA, EM, EH (negro y rojo) y FA02 (rojo) fueron designados con números.

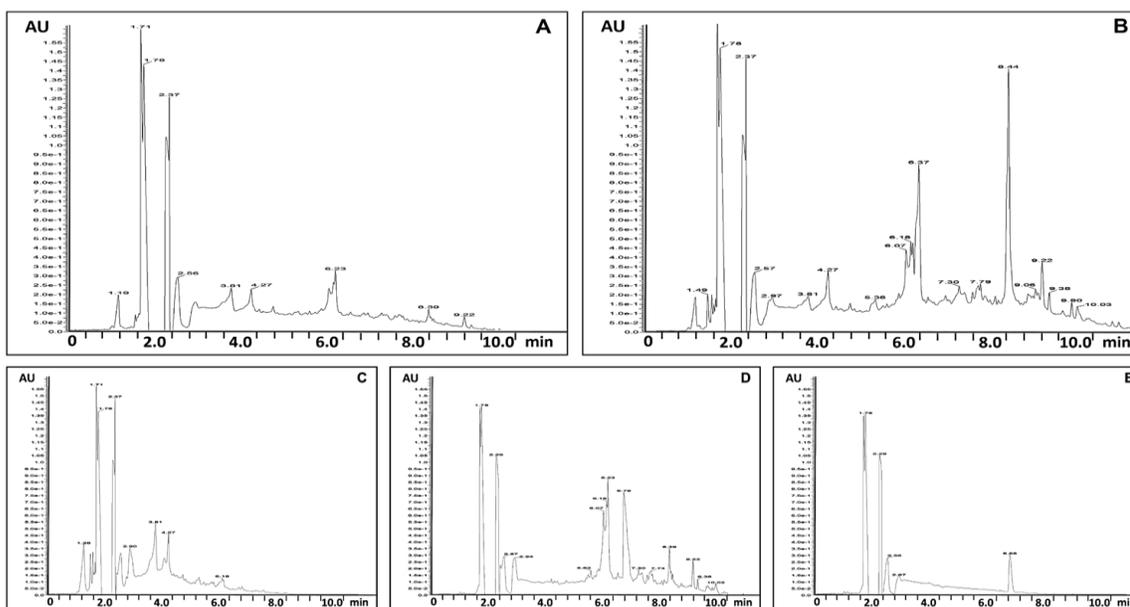


Figura 15. Perfil cromatográfico de la composición fitoquímica de RHTR por UPLC-PAD. Los cromatogramas se obtuvieron a 280 nm. (A), EA. (B), EM. (C), FA01. (D), FA02. (E), FA03.

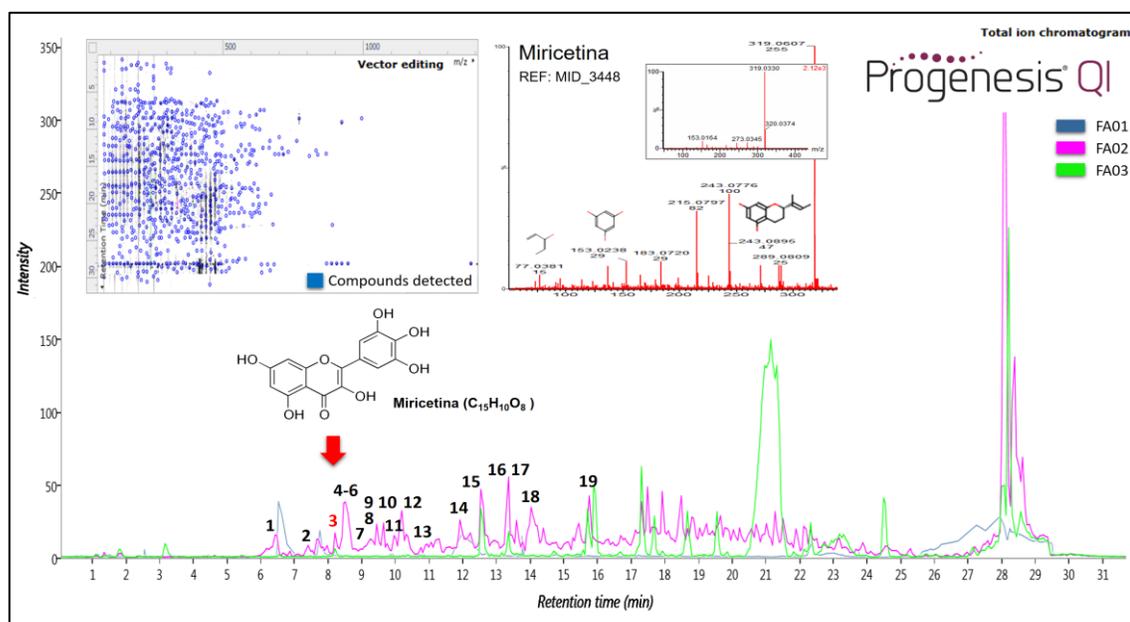


Figura 16. TIC por UPLC-MS^E con la composición fitoquímica de las fracciones del EA de RHTR. En la figura se observa el TIC por ESI⁺ de FA01, FA02 y FA03 con el compuesto miricetina presente en todas ellas a 8.27 min (Compuesto No. 3) y con mayor abundancia relativa en FA02. El mapa de vectores señala 215 identificaciones putativas de 555 compuestos encontrados en FA02. Patrón de fragmentación de la miricetina en FA02 por comparación con el compuesto estándar.

Tabla 6. Compuestos fitoquímicos más abundantes en RHTR por UPLC-MS^E.

Compuesto	Masa neutra (Da)	TR (min)	ID	Nombre	Fórmula	Score (%)	Actividad biológica	Presencia en plantas	Referencia
5	342.1136	1.72	CHEBI:17505	α -D-galactosil-(1 \rightarrow 3)-1D-mio-inositol	C12H22O11	98.98	Metabolismo		http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chebi&param=CHEBI:17505
33	192.0628	4.32	CSID16498843	Ácido quínico	C7H12O6	99.50	Metabolismo		http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chebi&param=CHEBI:17521
49	450.0798	6.18	HMDB41635	Miricetina 3-arabinosido	C20H18O12	98.42	Antioxidante	<i>Rhus</i> spp	http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB41635
57	184.0372	6.44	CSID70398	Metil galato*	C8H8O5	97.08	Antioxidante	<i>Rhus</i> spp	http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chemspider&param=70398
93	318.0376	8.27	CHEBI:18152	Miricetina*	C15H10O8	99.26	Antioxidante	<i>Rhus</i> spp	https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:18152
99	170.0215	8.52	CHEBI:30778	Ácido gálico*	C7H6O5	94.96	Antibacteriano, antioxidante, citotóxico	<i>Rhus</i> spp	http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chebi&param=CHEBI:30778
105	940.1182	8.52	CHEBI:18082	1,2,3,4,6-pentakis-O-galoiil- β -D-glucosa	C41H32O26	94.65	Antioxidante, antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chemspider&param=4444112
107	302.0427	8.60	CHEBI:16243	Quercetina*	C15H10O7	94.87	Antioxidante, antiinflamatorio, citotóxico	<i>Rhus</i> spp	https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16243
124	448.1006	9.45	CSID4444112	Quercitrina*	C21H20O11	98.87	Antioxidante		http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=chemspider&param=4444112
131	616.1064	9.97	LMPK12112447	Miricetina 3-(4"-galoiilrhamnosido)	C28H24O16	98.49	Antioxidante		http://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMPK12112447
137	256.1099	10.20	LMPK12100067	Obtusaquinol	C16H16O3	94.79		<i>Dalbergia retusa</i>	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/obtusaquinol
149	286.0477	11.92	LMPK12111566	Fisetina*	C15H10O6	97.60	Antineoplásico, antioxidante, citotóxico	<i>Rhus</i> spp	http://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMPK12111566
153	273.2744	12.54	LMFA01010048	Ácido margárico	C17H31D3O2	94.64	Antioxidante, antifúngico	<i>Rhus typhina</i>	http://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMFA01010048
162	538.0900	13.91	LMPK12040009	Amentoflavona	C30H18O10	91.38	Antioxidante, antiinflamatorio	<i>Rhus</i> spp	http://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMPK12040009

En verde, se indican los compuestos mayoritarios en RHTR. (RT), tiempo de retención. (Score %), porcentaje de similitud con el compuesto reportado. (*), compuestos confirmados con estándares

Tabla 7. Compuestos fitoquímicos en RHTR por GC-MS.

Compuesto	Masa Neutra (Da)	TR (min)	Muestra	Nist ID	Nombre	Fórmula	Score (%)	Actividad biológica	Presencia en plantas	Referencia
1	172.1463	5.90	HE	1765	4-hidroxi-3-propil-2-hexanona	C9H18O2	90.30		<i>Ruellia tuberosa</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.468050.html
2	202.1755	7.50	HE	1468	2-metil-2-undecanetriol	C12H26S	90.00	Antibacteriano	<i>Azadirachta indica</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.74301.html
3	154.1357	9.10	HE	1756	(Z)-2-decenal	C10H18O	91.40	Antiparasitario	<i>Rhus coriaria</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446466.html
4	152.1201	10.01	HE	31387	(E,E)-2,4-decadienal	C10H16O	92.60	Antiparasitario	<i>Rhus coriaria</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446470.html
5	128.0473	10.25	ME	5417	2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (furaneol)	C6H8O3	90.00	Antibacteriano, antifúngico	<i>Fagopyrum esculentum</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.18218.html
6	138.1044	10.57	HE	31432	(E,E)-2,4-nonadienal	C9H14O	91.70	Antibacteriano	<i>Hylocomium splendens</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446460.html
7	182.167	11.08	HE	1791	(E)-2-dodecenal	C12H22O	92.60	Antiparasitario	<i>Coriandrum sativum</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446482.html
8	168.1514	11.61	HE	23718	2-undecenal	C11H20O	96.10	Antiparasitario	<i>Rhus coriaria</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4446477.html

9	144.0422	12.88	ME	4836	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP)	C6H8O9	94.10	Antibacteriano, antiinflamatorio, antimutagénico	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Juglans regia</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.106997.html
10	200.1776	22.87	HE	28380	Ácido 8-metil-decanoico, metil ester	C12H24O2	93.30	Antiparasitario	<i>Eupatorium triplinerve</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14847.html
11	105.0425	23.31	ME	11575	Ácido 2-(aminoxi)propanoico	C3H7O3N	93.10	Antibacteriano		http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.68526.html
12	294.2558	28.50	HE	21420	Ácido 9,12-octadecadienoico, metil ester (metil linoleato)	C19H34O2	91.70	Antiparasitario, antihistamínico, antiinflamatorio, antineoplásico	<i>Pergularia daemia</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4447491.html
13	254.2245	28.70	HE	13197	Ácido 9-hexadecanoico (Ácido palmitoleico)	C16H30O2	96.70	Antibacteriano	<i>Rhus coriaria</i> , <i>Rhus typhina</i>	http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393216.html

En verde, se indican los compuestos más abundantes en el EM y el EH. (TR), tiempo de retención. (Score %), porcentaje de similitud con el compuesto reportado.

9.3 Identificación de metil galato por RMN.

El compuesto metil galato (C₈H₈O₅), fue purificado del EM de RHTR por CC e identificado posteriormente por RMN a 300 MHz. En la Figura 17, se muestra el espectro de RMN para C₈H₈O₅, reportándose los δ (ppm) del compuesto, así como su estructura química. Metil galato (3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo, C₈H₈O₅): RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD) δ: 7.07 (H-2, H-6), δ: 4.9 (H-3, H-4, H-5), δ: 3.8 (H-8). RMN-¹³C (300 MHz, CD₃OD) δ: 122.3 (C-1), δ: 110.9 (C-2, C-6), δ: 147.3 (C-3, C-5), δ: 140.6 (C-4), δ: 169.8 (C-7), δ: 53.1 (C-8). La identificación obtenida, fue similar a la reportada por otros autores en la literatura [Kamatham y cols., 2015; Mohd Nazrul Hisham y cols., 2011]. El metil galato, es un compuesto que se encuentra presente en varias especies del género *Rhus* [Rayne y Mazza, 2007], el cual es un derivado del ácido gálico y ha demostrado tener actividad antioxidante, antimicrobiana y antineoplásica en diversas investigaciones [Kim y cols., 2016; Khurana y cols., 2014; Lee y cols., 2010], por lo cual fue evaluada su actividad biológica en células SKOV-3 (apartado 9.6).

9.4 Propiedades farmacológicas *in silico* de los principios activos en RHTR.

Se llevó a cabo un análisis *in silico* de los compuestos mayoritarios en la fracción activa FA02 de RHTR, para determinar su parecido con fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer. Con este fin, se analizó la estructura química de los diferentes compuestos con el “*drug-likeness model*” de Molsoft© y se realizó una búsqueda bibliográfica de sus propiedades medicinales (Tabla 8).

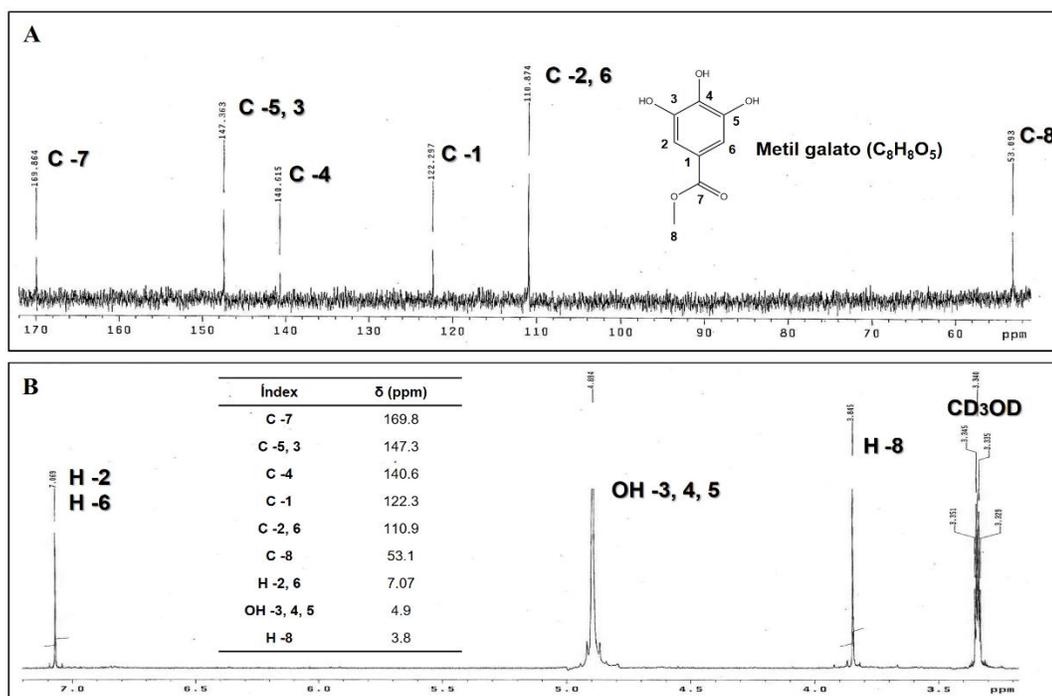


Figura 17. Espectro del 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo ($C_8H_8O_5$) por RMN a 300 MHz. En la figura se muestra los δ (ppm) y su estructura química. (A), RMN- ^{13}C . (B), RMN- 1H .

Los compuestos que presentaron una puntuación más alta fueron: miricetina 3-(4''-galoilrhamnosido) (1.12), quercitrina (1.04), quercetina (0.93), miricitrina (0.78) y fisetina (0.76). Sin embargo, la miricetina presentó un valor de -0.04, posiblemente debido a una menor especificidad de su efecto farmacológico, ya que el modelo también utiliza los criterios de Lipinski para predecir su actividad biológica (Tabla 9). Los compuestos mencionados, se clasifican dentro del grupo de los polifenoles y se han identificado en otras especies del género *Rhus*, los cuales presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria y antineoplásica principalmente (Tabla 8) [Rayne y Mazza, 2007]; por tanto, fueron seleccionados para evaluar su actividad citotóxica contra células SKOV-3. Los resultados obtenidos, demostraron que el ácido gálico (PubChem CID: 370) y la miricetina (PubChem CID: 5281672), son los compuestos responsables de la actividad biológica en RHTR, ya que lograron inhibir la viabilidad celular a una menor concentración, en comparación con los demás (apartado 9.6), por lo cual fueron seleccionados para determinar su efecto antineoplásico sobre lesiones tumorales.

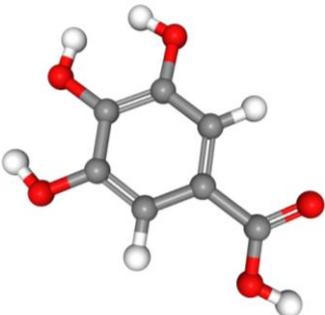
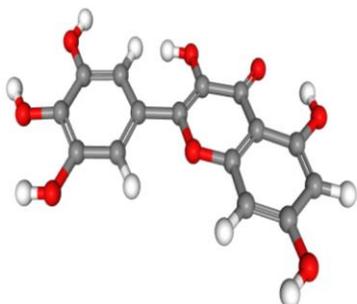
Adicionalmente, se realizó una búsqueda de las propiedades farmacológicas de los compuestos en los servidores ACD/I-Labs®, Zinc15 y SEA (Tabla 9), por medio de un acoplamiento inverso proteína-ligando, para conocer su mecanismo molecular y sus posibles efectos toxicológicos. Con este fin, se logró observar que el ácido gálico y la miricetina presentan una similitud en sus estructuras (Tabla 9), ya que ambos compuestos poseen tres grupos funcionales hidroxilo, que se encuentran unidos a un anillo aromático bencénico, lo que les permite interactuar con el sitio de unión a ATP de diferentes proteínas, las cuales se encuentran listadas en la Tabla 9. En cuanto a sus propiedades toxicológicas, ambos compuestos presentan un efecto moderado, así como una DL₅₀ y máxima dosis diaria recomendada (MDDR) vía subcutánea de 3,300 y 18.48 mg/kg para el ácido gálico, mientras que para la miricetina fue de 120 y 2.24 mg/kg respectivamente. Finalmente, estas concentraciones fueron tomadas en cuenta para determinar la dosis terapéutica a emplear, en los estudios de actividad antineoplásica en ratones xenotrasplantados con células SKOV-3.

Tabla 8. Compuestos fitoquímicos en FA02 de RHTR por UPLC-MS^E.

Comp.	Masa neutra (Da)	TR (min)	Max. Abun.	ID	Nombre compuesto	Fórmula	Propiedades medicinales	Presencia en plantas	Drug-likeness model Score.
1	450.0798	6.18	32.82	HMDB41635	Miricetina 3-arabinosida	C20H18O12	Antioxidante, Anticarcinogénico	<i>Rhus</i> spp	0.90
2	436.1158	7.05	44.98	HMDB38831	Epigallocatequina 3-cinamato	C24H20O8	Antioxidante, antibacteriano	<i>Cocotea porosa</i>	0.24
3	318.0376	8.27	33.7	CHEBI:18152	Miricetina	C15H10O8	Antioxidante, antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	-0.04
4	464.0955	8.47	59.42	LMPK12112436	Miricitrina	C21H20O12	Antioxidante, antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	0.78
5	748.1487	8.52	35.74	LMPK12110568	Quercetina 3-(2"-galoilglucosil)-(1→2)-α-L-arabinofuranosido	C33H32O20	Antioxidante	<i>Euphorbia pachyrrhiza</i>	1.24
6	940.1182	8.52	152.41	CHEBI18082	1,2,3,4,6-pentakis-O-galoil-β-D-glucosa	C41H32O26	Antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	0.35
7	302.0427	8.60	31.05	CHEBI:16243	Quercetina	C15H10O7	Antioxidante, antiinflamatorio, antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	0.93
8	1092.1291	9.13	39.79	CSID24784962	4-O-digaloil-1,2,3,6-tetra-O-β-D-galoilglucosa	C48H36O30	Antibacteriano, antineoplásico, antitrombotico	<i>Rhus typhina</i>	0.35
9	258.0890	9.45	30.71	CHEBI:5715	Hibiscoquinona A	C15H14O4	Antioxidante	<i>Hibiscus</i> spp	-0.52
10	448.1006	9.45	33.71	LMPK12112171	Quercitrina	C21H20O11	Antioxidante, antineoplásico	<i>Rhus</i> spp	1.04
11	616.1064	9.96	78.88	LMPK12112447	Miricetina 3-(4"-galoilramnosido)	C28H24O16	Antioxidante		1.12
12	256.1099	10.20	34.89	LMPK12100067	Obtusaquinol	C16H16O3	Antiparasitario, inhibidor de óxido nítrico	<i>Dalbergia</i> spp	-0.03
13	562.1475	10.94	28.39	CSID35013429	Epifisetinidol-(4β→8)-catequina	C30H26O11	Antibacteriano, inhibidor de amilasa y lipasa	<i>Rhus</i> spp	0.61
14	286.0477	11.92	33.95	LMPK12111566	Fisetina	C15H10O6	Antineoplásico, antioxidante, antiangiogénico	<i>Rhus</i> spp	0.76
15	273.2744	12.54	64.35	LMFA01010048	Ácido margárico	C17H31D3O2	Antioxidante, antifúngico	<i>Rhus typhina</i>	-0.33
16		13.36	69.46		Desconocido				
17		13.36	42.48		Desconocido				
18	538.0900	13.9	45.8	LMPK12040009	Amentoflavona	C30H18O10	Antioxidante, antiinflamatorio	<i>Rhus</i> spp	0.51
19	339.3263	15.71	38.18	CHEBI:23858	Ácido docosanoico	C22H43O2	Antiparasitario	<i>Prosopis cineraria</i>	-0.33

En verde, se indican los compuestos más abundantes en la FA02 por comparación con el EA de RHTR. (TR), tiempo de retención. (ID), identificación del compuesto.

Tabla 9. Propiedades moleculares y farmacológicas *in silico* de los principios activos en RHTR.

Compuesto: Ácido gálico (ZINC1504)		Propiedades QSAR				
		<ul style="list-style-type: none"> Área superficial: 216.92 Å² Volumen: 142.94 Å³ Energía de hidratación: -4.62 kcal/mol Coefficiente de reparto octanol:agua (LogP): 0.55 LogS: -0.80 (in Log(moles/L)) 27147.75 (in mg/L) Refractividad: 38.69 Å³ Polarizabilidad: 12.17 Å³ Masa: 164.07 uma Tensión superficial: 109.2 dyne/cm Densidad: 1.749 g/cm³ 				
		Propiedades de Lipinski				
		<ul style="list-style-type: none"> Peso molecular: 170.02 HBD: 4 HBA: 5 PSA: 77.22 Å² Enlaces giratorios: 1 				
Propiedades farmacológicas						
<ul style="list-style-type: none"> DL₅₀ (mg/kg) Subcutánea: 3,300 (límite) Farmacocinética (AMES): 0.09 (moderado) MDDR (mg/kg): 18.48 (sin efectos a la salud) Inhibidor de canales hERG (µM): 0.09 Riesgo genotóxico: fragmentos no peligrosos 						
Blancos terapéuticos (Farmacóforo)						
Clave gen	Nombre	Organismo	Descripción	pKi (L.E.)	P-Value	Max Tc
Q2PCB5_DICLA	CA: alfa-anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1)	Eucariota	Enzima	5.38 (0.63)	1.246E-79	1
Compuesto: Miricetina (ZINC3874317)		Propiedades QSAR				
		<ul style="list-style-type: none"> Área superficial: 481.98 Å² Volumen: 292.39 Å³ Energía de hidratación: -11.57 kcal/mol Coefficiente de reparto octanol:agua (LogP): 1.73 LogS: -3.29 (in Log(moles/L)) 164.52 (in mg/L) Refractividad: 79.27 Å³ Polarizabilidad: 23.99 Å³ Masa: 308.16 uma Tensión superficial: 133.0 dyne/cm Densidad: 1.912 g/cm³ 				
		Propiedades de Lipinski				
		<ul style="list-style-type: none"> Peso molecular: 318.04 HBD: 6 (> 5) HBA: 8 PSA: 118.09 Å² Enlaces giratorios: 1 				
Propiedades farmacológicas						
<ul style="list-style-type: none"> DL₅₀ (mg/kg) Subcutánea: 120 (moderado) Farmacocinética AMES: 0.85 (moderado) MDDR (mg/kg): 2.24 (límite, efecto en pulmones, sangre y riñones) Inhibidor de canales hERG (µM): 0.2 (moderado) Riesgo genotóxico: andamio de tipo quinona o similar 						
Blancos terapéuticos (Farmacóforo)						
Clave gen	Nombre	Organismo	Descripción	pKi (L.E.)	P-Value	Max Tc
VE6_HPVI6	E6: Protein E6	Virus papiloma	Oncoproteína	6.07 (0.37)	6.6E-117	1
FPS_FUJSV	V-FPS: Tyrosine-protein kinase transforming protein Fps	Virus sarcoma fujinami	Enzima quinasa viral	5.74 (0.35)	1.1E-110	1
Q965D7_PLAFA	fabZ: Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	<i>P. falciparum</i>	Enzima: sintasa de ácidos grasos	5.70 (0.35)	6.66E-84	1
O96394_LEIAM	Arginase	<i>L. amazonensis</i>	Enzima	5.92 (0.36)	1.89E-76	1

XDH_HUMAN	XDH: Xanthine dehydrogenase/oxidase	Eucariota	Enzima	5.62 (0.34)	4.62E-42	1
Q965D5_PLAFA	fabI: Enoyl-acyl-carrier protein reductase	<i>P. falciparum</i>	Enzima	6.40 (0.39)	5.91E-26	1
LGUL_HUMAN	GLO1: Lactoylglutathione lyase	Eucariota	Enzima	6.25 (0.38)	1.24E-21	1
KDM4E_HUMAN	KDM4E: Lysine-specific demethylase 4E	Eucariota	Regulador epigenético	5.52 (0.34)	1.11E-16	1
MRP1_HUMAN	ABCC1: Multidrug resistance-associated protein 1	Eucariota	Transportador	5.62 (0.34)	2.22E-16	1
Q7ZJM1_9HIV1	Pol: Integrase	VIH	Enzima	6.22 (0.38)	2.17E-14	1
TAU_HUMAN	MAPT: Microtubule-associated protein tau	Eucariota	Estructural	5.92 (0.36)	1.00E-11	1
GPR35_HUMAN	GPR35: G-protein coupled receptor 35	Eucariota	Receptor de membrana	5.67 (0.35)	1.58E-10	1
APEX1_HUMAN	APEX1: DNA (apurinic or apyrimidinic site) lyase	Eucariota	Enzima	6.49 (0.40)	1.44E-08	1
TOP2A_HUMAN	TOP2A: DNA topoisomerase 2-alpha	Eucariota	Enzima isomerasa	6.41 (0.39)	3.61E-08	1
MYLK_HUMAN	MYLK: Myosin light chain kinase, smooth muscle	Eucariota	Enzima quinasa	5.77 (0.35)	6.68E-08	1
CP19A_HUMAN	CYP19A1: Aromatase	Eucariota	Enzima p450	5.0 (0.30)	0.000899	1
FLT3_HUMAN	FLT3: Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3	Eucariota	Enzima quinasa	5.77 (0.35)	0.007316	1
KSYK_HUMAN	SYK: Tyrosine-protein kinase SYK	Eucariota	Enzima quinasa	5.19 (0.32)	0.0282	1
INSR_HUMAN	INSR: Insulin receptor	Eucariota	Enzima quinasa	5.59 (0.34)	0.02978	1
ACES_HUMAN	ACHE: Acetylcholinesterase	Eucariota	Enzima hidrolasa	7.92 (0.48)	0.04347	1
CP1A2_HUMAN	CYP1A2: Cytochrome P450 1A2	Eucariota	Enzima p450	6.43 (0.39)	0.0741	1
ABC3G_HUMAN	APOBEC3G: DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3G	Eucariota	Enzima	---	0.09968	1
BACE1_HUMAN	BACE1: Beta-secretase 1	Eucariota	Enzima proteasa	5.55 (0.34)	0.1128	1
PK3CG_HUMAN	PIK3CG: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	Eucariota	Enzima	5.33 (0.32)	0.4999	1

(*HBD*), donador de puentes hidrógeno; (*HBA*), aceptor de puentes hidrógeno; (*PSA*), área superficial polar; (*DL*₅₀), dosis letal del 50%; (*MDDR*), máxima dosis diaria recomendada vía subcutánea.

9.5 Actividad biológica de RHTR en líneas celulares.

La actividad biológica del EA de RHTR y sus fracciones, se evaluó en células de cáncer SKOV-3, así como epiteliales CHO-K1 y BEAS-2B a distintas concentraciones durante 24 h para determinar la *CI*₅₀.

Los resultados obtenidos, revelaron que todas las muestras presentaron actividad en SKOV-3 por debajo de 100 µg/mL (Figura 18A), con base en los criterios del Instituto Nacional del Cáncer en EE.UU., para la búsqueda de nuevos candidatos terapéuticos [Suffness y Pezzuto, 1990]. Sin embargo, la actividad más alta se encontró en el EA a 50 µg/mL y en la FA02 a 38 µg/mL respectivamente, los cuales fueron estadísticamente significativos en la prueba de Dunnett, con respecto al grupo control de vehículo PBS 1X

($p \leq 0.05$) (Tabla 10). Los ensayos de morfología y muerte celular que se utilizaron para evidenciar cambios citológicos en SKOV-3, revelaron que las células tratadas con EA y FA02 tenían una morfología similar al grupo control; sin embargo, presentaron un aumento considerable de vacuolas citoplasmáticas y ausencia de mitosis celular, lo cual sugiere un efecto quiescente (Figura 18D). Mientras el ensayo TUNEL, demostró la fragmentación del ADN nuclear en células tratadas con el EA (7.85 %) y la FA02 (11.6 %), así como en el grupo tratado con paclitaxel (50.7 %), debido a la activación de un proceso apoptótico (Figura 18D).

En los ensayos con CHO-K1 y BEAS-2B, el EA presentó una CI_{50} de 700 $\mu\text{g/mL}$ y la FA02 de 600 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18B y C), las cuales fueron significativas en la prueba de Dunnett con respecto a la viabilidad presentada por el grupo control ($p \leq 0.05$) (Tabla 10). Los análisis de morfología y muerte celular (Figura 18D), demostraron una disminución del citoplasma, condensación de la cromatina, pérdida del contacto intercelular, ausencia de división mitótica y la inducción de apoptosis del 13.03 % y 14.71 % para el EA, así como del 29.61 % y 19.10 % para la FA02, respectivamente ($p \leq 0.05$, ANOVA). Por último, el ensayo cometa en células CHO-K1 reveló un efecto genotóxico, presentándose daño en el ADN con el EA del 5 al 10 % y con la FA02 del 10 al 40 % respectivamente (Figura 18E). Estos resultados, demuestran que RHTR presenta un efecto selectivo por células cancerosas, ya que el EA obtuvo un IS de 14 mientras la FA02 de 15.8 en comparación con el control de paclitaxel a 1.3 (Tabla 10), por lo cual podría tener un papel importante en la prevención y eliminación de cáncer.

9.6 Actividad biológica de principios activos de RHTR en líneas celulares.

Se evaluó la actividad biológica del ácido gálico, metil galato, miricetina, miricitrina, quercetina, quercitrina y fisetina en células epiteliales de cáncer SKOV-3, así como fenotipo normal transformado BEAS-2B y CHO-K1, a distintas concentraciones durante 24 h para determinar la CI_{50} .

Se demostró que todos los compuestos presentaron actividad biológica en SKOV-3 a concentraciones menores de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19A). Sin embargo, la actividad más alta se encontró en el ácido gálico y la miricetina a 50 y 166 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo con-

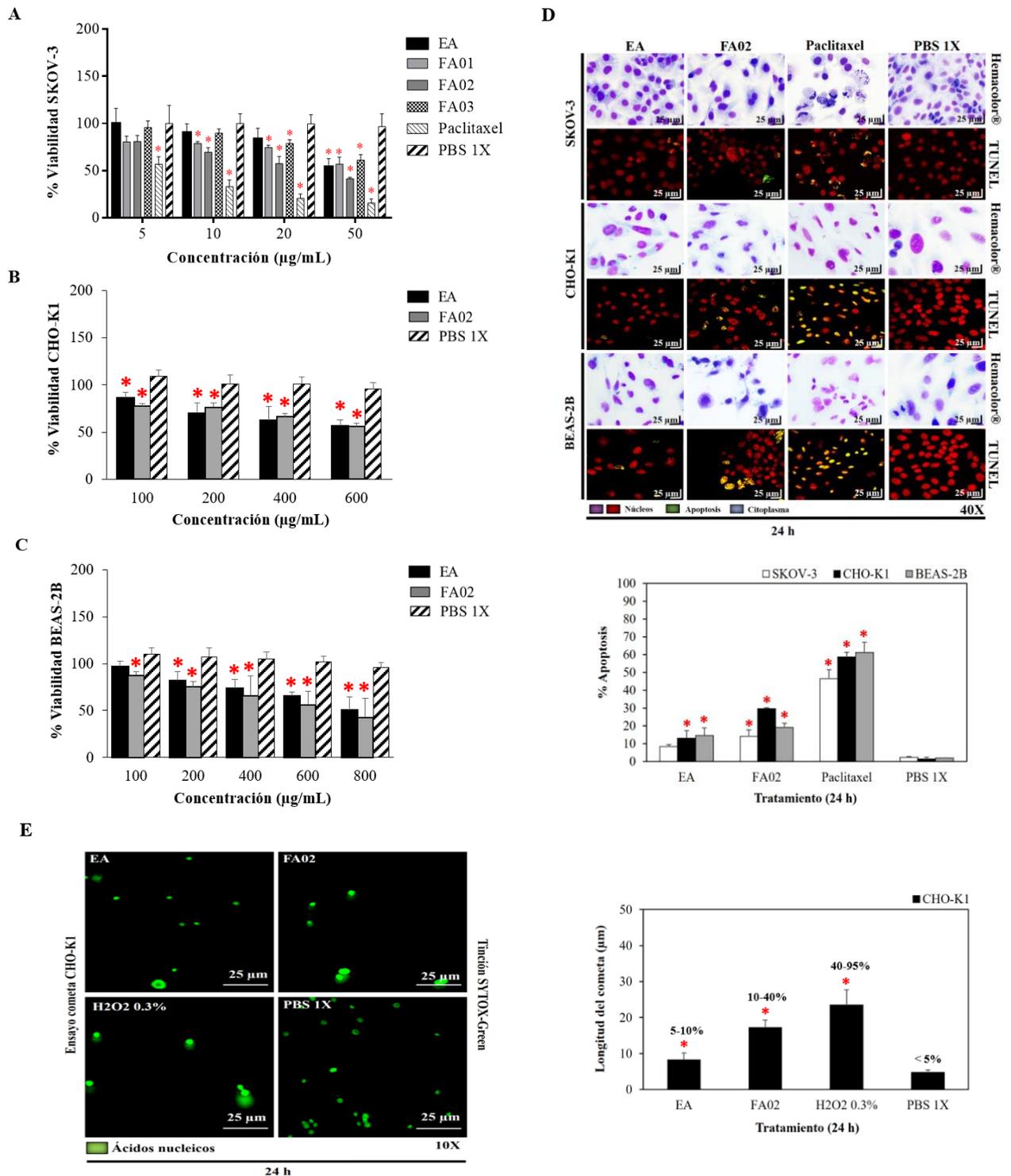


Figura 18. Actividad biológica del EA y la FA02 de RHTR en líneas celulares de cáncer y epiteliales. Se determinó la CI_{50} con curvas de viabilidad dosis-respuesta con MTT durante 24 h en SKOV-3 (A), CHO-K1 (B) y BEAS-2B (C). Los cambios morfológicos con tinción rápida de Hemacolor® y la inducción de

apoptosis por TUNEL se observaron a las 24 h de tratamiento en SKOV-3 (EA, 50 µg/mL y FA02, 38 µg/mL), CHO-K1 y BEAS-2B (EA, 700 µg/mL y 600 µg/mL) (D). Se evaluó la migración del ADN dañado con SYTOX-Green, mediante electroforesis unicelular en condiciones alcalinas (ensayo cometa) a 24 h de finalizados los tratamientos con EA y FA02 a 600 µg/mL en células CHO-K1 (E). Los resultados muestran la media ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo PBS 1X ($p < 0.05$, ANOVA).

Tabla 10. CI_{50} de RHTR en las líneas celulares SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B.

Muestras	EA	FA01	FA02	FA03	Paclitaxel
SKOV-3	50	50	38	60	7
CHO-K1	600	ND	600	ND	10
BEAS-2B	800	ND	600	ND	8
DL_{50}	1,141.5	ND	1,209	ND	229
IS	14	ND	15.8	ND	1.3
Actividad	Media	Media	Media	Media	Alta

En la tabla se muestra: (CI_{50}), concentración inhibitoria del 50 % en µg/mL; (DL_{50}), dosis letal del 50 % en mg/kg; (IS), índice de selectividad; (ND) no determinado; (EA), extracto acuoso y (FA), fracción acuosa. Los números indican la fracción obtenida durante el fraccionamiento en fase sólida con disolventes, el cual se describe con mayor detalle en Materiales y Métodos. Los resultados representan tres experimentos independientes por triplicado (n = 9).

trol (vehículo, DMSO al 10 %) ($p \leq 0.05$, ANOVA). Al evaluar el efecto de los compuestos en BEAS-2B y CHO-K1 (Figura 19C y D), se observó actividad biológica a concentraciones menores de 100 µg/mL, demostrándose un efecto citotóxico el cual puede estar relacionado con la genotoxicidad reportada para los flavonoides. La mayor actividad fue observada en la miricetina a 33 µg/mL en CHO-K1 y el ácido gálico a 25 µg/mL en BEAS-2B; mientras la menor actividad se encontró en la quercitrina y el metil galato a 200 µg/mL en ambas líneas celulares, con respecto al grupo control (vehículo, DMSO al 10 %) ($p \leq 0.05$, ANOVA) (Tabla 11). Lo cual demuestra, que la actividad biológica de los compuestos está relacionada estrechamente con el fenotipo celular.

Tabla 11. CI_{50} de los principios activos en RHTR sobre SKOV-3, CHO-K1 y BEAS-2B.

Muestra	Ácido gálico	Metil galato	Miricetina	Miricitrina	Quercetina	Quercitrina	Fisetina	Paclitaxel
SKOV-3	50	> 200	166	197	> 200	> 200	200	7
BEAS-2B	25	200	64	160	189	> 200	50	8
CHO-K1	100	130	33	94	127	> 200	46	10

En la tabla se muestra la concentración inhibitoria al 50 % (CI_{50}) en µg/mL. Los resultados representan tres experimentos independientes por triplicado (n = 9).

Los ensayos de morfología celular en SKOV-3 con la CI_{50} de los compuestos durante 24 h, revelaron individualización, redondeamiento, pérdida de microfilamentos, condensación del citoplasma, fragmentación nuclear y una ruptura de la monocapa celular, efectos similares a los encontrados en el grupo control tratado con paclitaxel. Mientras tanto, las células tratadas con vehículo presentaron lamelopodios, filopodios, fibras de estrés, puntos de adhesión, mitosis, confluencia y formación de la monocapa celular (Figura 19B).

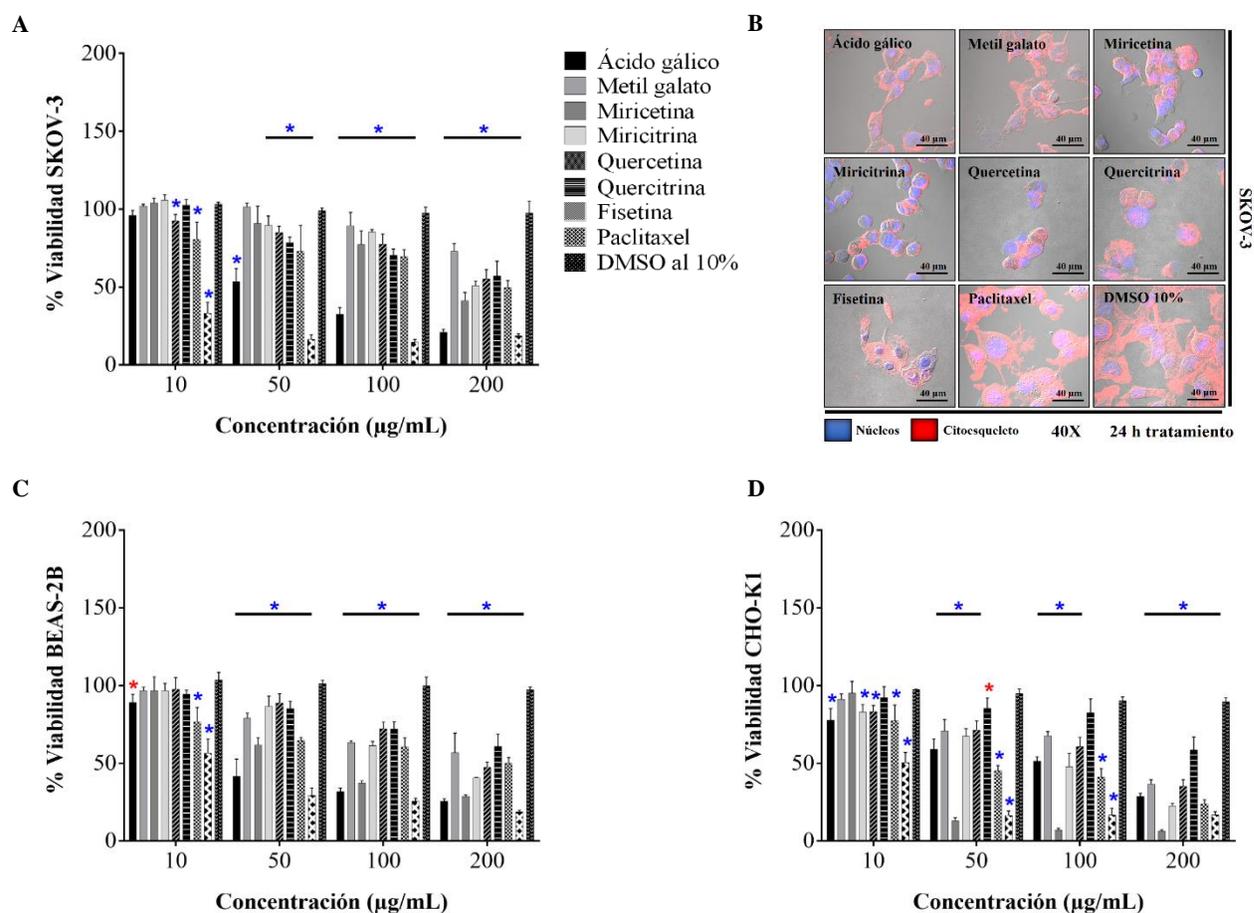


Figura 19. Actividad biológica de principios activos en RHTR sobre líneas celulares de cáncer y epiteliales. Se determinó la CI_{50} por curvas de viabilidad dosis-respuesta con MTT durante 24 h en SKOV-3 (A), BEAS-2B (C) y CHO-K1 (D). Los cambios morfológicos se observaron por ICHIF con faloidina-rhodaminada (actina filamentosa) y DAPI (núcleos) a las 24 h de tratamiento en SKOV-3 con la CI_{50} de los compuestos reportada en la Tabla 11 (B). Los resultados muestran la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado ($n = 9$) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (DMSO 10 % en PBS 1X) ($p < 0.05$, ANOVA).

Los resultados obtenidos, demuestran que los principales compuestos en RHTR contra las células de cáncer ovárico son el ácido gálico y la miricetina, por lo cual fueron seleccionados para evaluar su actividad antineoplásica en ratones xenotrasplantados con células SKOV-3.

9.7 Actividad antineoplásica de RHTR en ratones xenotrasplantados con SKOV-3.

Se evaluó la actividad antineoplásica del EA y la FA02 de RHTR en ratones xenotrasplantados con células de cáncer SKOV-3, administrados vía i.p. a 200 mg/kg/día durante 28 días, para determinar su efectividad en el tratamiento alternativo del cáncer ovárico. Durante su administración, no se observaron cambios de comportamiento en los roedores como agitación, temblor, somnolencia, pérdida de apetito o algún signo de toxicidad como disnea, fotofobia, ceguera, diarrea, insuficiencia cardíaca, debilidad muscular, convulsiones y pigmentación epitelial, los cuales fueron inicialmente evaluados durante las primeras horas del estudio y finalizadas las 24 h de tratamiento.

Adicionalmente, se monitoreó el peso corporal de los roedores durante los 28 días de tratamiento, encontrándose una disminución del 9.5 % para el grupo tratado con el EA, mientras un aumento del 3.7 % se presentó para los tratados con la FA02. Sin embargo, los cambios no resultaron significativos con respecto al grupo control tratado con vehículo PBS 1X ($p > 0.05$, ANOVA) (Figura 20A).

Al finalizar los tratamientos, los roedores sometidos a eutanasia para la recuperación de las lesiones tumorales, observándose macroscópicamente cambios en la forma, superficie y color de los tumores desarrollados (Figura 20B). En todos los grupos con tratamiento se presentaron tumoraciones ovoides, de superficie lisa, con aspecto sólido y vascularidad similar, así como diferencias en el color, el cual fue rosado para EA y blanquecino para FA02, mientras el grupo tratado con carboplatino y vehículo presentaron una superficie nodular y una coloración amarilla predominante. Al analizar el peso de los tumores (Figura 20B), se observó mayor masa tumoral en los tratados con el vehículo, el cual fue de 0.33 ± 0.09 g, seguido por el grupo tratado con EA de 0.24 ± 0.09 g, posteriormente por el grupo con FA02 de 0.18 ± 0.9 g y finalmente el grupo de carboplatino con 0.14 ± 0.7 g respectivamente. Los resultados mostrados, correlacionan

con el seguimiento del volumen tumoral a las lesiones presentes en los roedores (Figura 20C), observándose una disminución significativa a partir de los 14 a 28 días de tratamiento con EA, FA02 y carboplatino, el cual fue del 37.6, 49 y 74.5 % respectivamente, por comparación con el grupo tratado con vehículo ($p \leq 0.05$, Dunnett). Estos hallazgos demuestran cambios en la evolución de la enfermedad, los cuales se relacionan directamente con los tratamientos utilizados durante el estudio.

Resultados similares se encontraron, al medir la longitud mayor de los tumores presentes en los distintos grupos de estudio posterior al tratamiento (Figura 20D); observándose en los ratones tratados con el vehículo 14.53 ± 2.36 mm, seguido del EA con 9.06 ± 0.25 mm, para FA02 con 7.4 ± 0.95 mm y por último los tratados con carboplatino de 3.7 ± 0.26 mm, demostrándose un efecto citostático durante los tratamientos. Sin embargo, al comparar la longitud mayor inicial al tratamiento (Figura 20D), se demuestra una progresión de la enfermedad en los ratones tratados con EA y FA02, al presentar un aumento del 70.9 y 60.8 % respectivamente ($p \leq 0.05$, ANOVA), mientras aquéllos tratados con el vehículo fue del 190 % y por último con carboplatino, el cual presentó una disminución del 19.5 %, relacionándose con una progresión estable de la enfermedad, según los porcentajes manejados por el RECIST 1.1.

9.7.1 Estudios de Imagenología por TAC y USG.

Se realizaron tomografías de cuerpo completo con dirección craneocaudal, en fase simple en cortes axiales; grosor de corte de 0.6 mm y reconstrucciones multiplanares (Figura 21A); donde se observó en todos los grupos tumores ovoides, localizados en el tejido celular subcutáneo y con unidades de atenuación en relación a partes blandas, los cuales se encontraron entre los rangos de 47 a 50 UH (Figura 20B), con diferencias en sus bordes que fueron regulares para los grupos tratados con EA y FA02, así como lobulados para los grupos tratados con carboplatino y vehículo. El porcentaje en el área de necrosis fue mayor en los ratones tratados con vehículo del 35.16 %, mientras los tratados con EA, FA02 y carboplatino correspondió al 30.68, 20.54 y 5.19 % respectivamente.

Se complementó el estudio imagenológico con ultrasonografías de los diferentes tu-

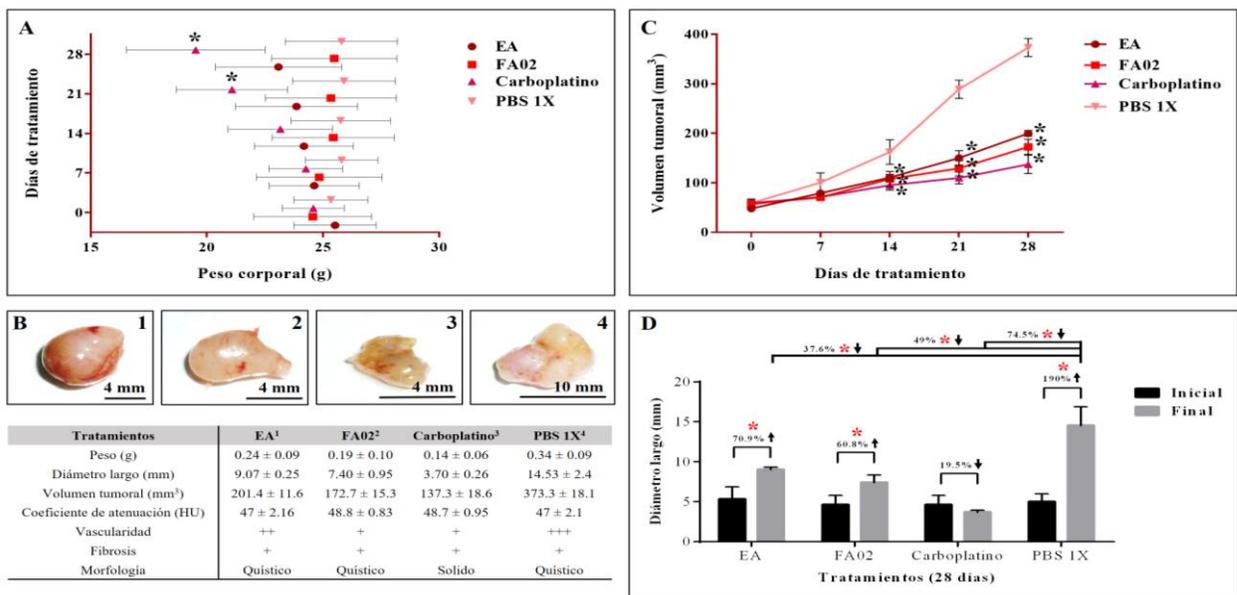


Figura 20. Actividad antineoplásica del EA y la FA02 de RHTR en lesiones tumorales de cáncer ovárico. Se monitoreó el peso corporal de los roedores con una báscula electrónica durante los tratamientos (A). Se analizaron las características y los cambios morfológicos presentes en las lesiones tumorales al finalizar los distintos tratamientos (B). Se determinó el volumen tumoral de las lesiones presentes en los roedores con un calibrador Vernier durante los 28 días del tratamiento con EA y FA02 a 200 mg/kg/día vía intraperitoneal ($Volumen (mm^3) = [Longitud * (Amplitud)^2] / 2$) (C). Se calculó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento con base en el volumen tumoral final con respecto al grupo control y la evolución de la enfermedad durante cada tratamiento con el diámetro inicial vs final (D). Los resultados muestran la media ± D.E. de dos experimentos independientes (n = 5). (*) Diferencias significativas con respecto al control de ratones tratados con vehículo PBS 1X ($p \leq 0.05$, ANOVA).

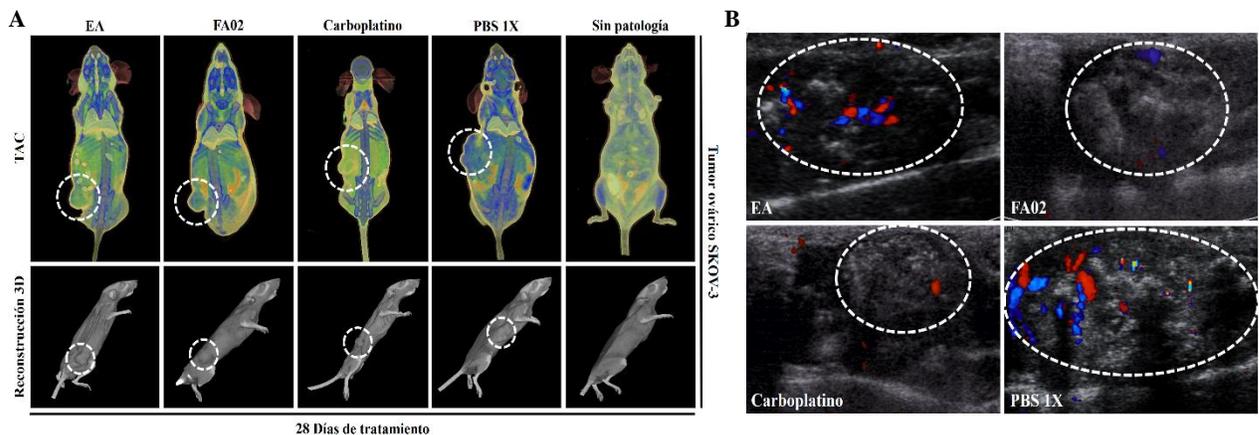


Figura 21. Correlación imagenológica de la actividad antineoplásica del EA y la FA02 de RHTR en lesiones tumorales de cáncer ovárico. Se realizó TAC (A) y USG (B) para observar cambios densimétricos y morfológicos en las lesiones tumorales, así como descartar procesos metastásicos durante los tratamientos. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5).

mores (Figura 21B), con transductor lineal multifrecuencia, en imagen y tiempo real, donde se corroboró su localización en tejido celular subcutáneo, y permitió la caracterización de las diferentes lesiones, las cuales se observaron con bordes parcialmente definidos, de contenido heterogéneo por la presencia de áreas hiperecoicas de distribución difusa con relación a fibrosis en los diferentes grupos. La vascularidad, se observa con un predominio en los ratones tratados con vehículo y reducida en los tratados con el EA y finalmente, menor en aquéllos tratados con FA02 o carboplatino.

9.7.2 Análisis histopatológicos de las lesiones tumorales tratadas con EA y FA02.

El análisis histológico de las lesiones quísticas presentes en los roedores y localizadas a nivel de dermis reticular, revelaron estroma medular de composición mixta y patrón sólido con predominio en comedo para EA y FA02, hiperqueratótico y basaloide para carboplatino, así como desmoplásico para vehículo (Figura 22). Adicionalmente, se observaron algunas características microscópicas similares en todos los tumores como tejido fibroso laxo, con una proliferación de células grandes, organizadas en un patrón sólido que crece empujando al estroma y zonas necróticas con predominio en los ratones tratados con vehículo de un 25 % en comparación con el 10 % observado en los tratados con EA, FA02 y carboplatino que fue del 10 %. Los tratamientos con RHTR, disminuyeron la vascularidad de las lesiones e indujeron mitosis atípicas y apoptosis en comparación con el grupo control, el cual presentó un aumento de la vascularidad, células con amplio citoplasma eosinofílico de núcleos mixtos, así como cromatina vesicular e indicios de inflamación aguda a crónica moderada, sin observar órgano residual, las cuales son características que corresponden a carcinomas poco diferenciados, posiblemente de tipo seroso papilar.

9.7.3 Evaluación toxicológica durante los tratamientos con EA y FA02.

Al finalizar los tratamientos, los ratones fueron sometidos a eutanasia para la obtención de muestras sanguíneas y la realización de las disecciones correspondientes. Con este fin, se llevó a cabo la observación anatómica del hígado, corazón, bazo, pulmones y riñones en busca de lesiones patológicas. Sin embargo, la morfología de los

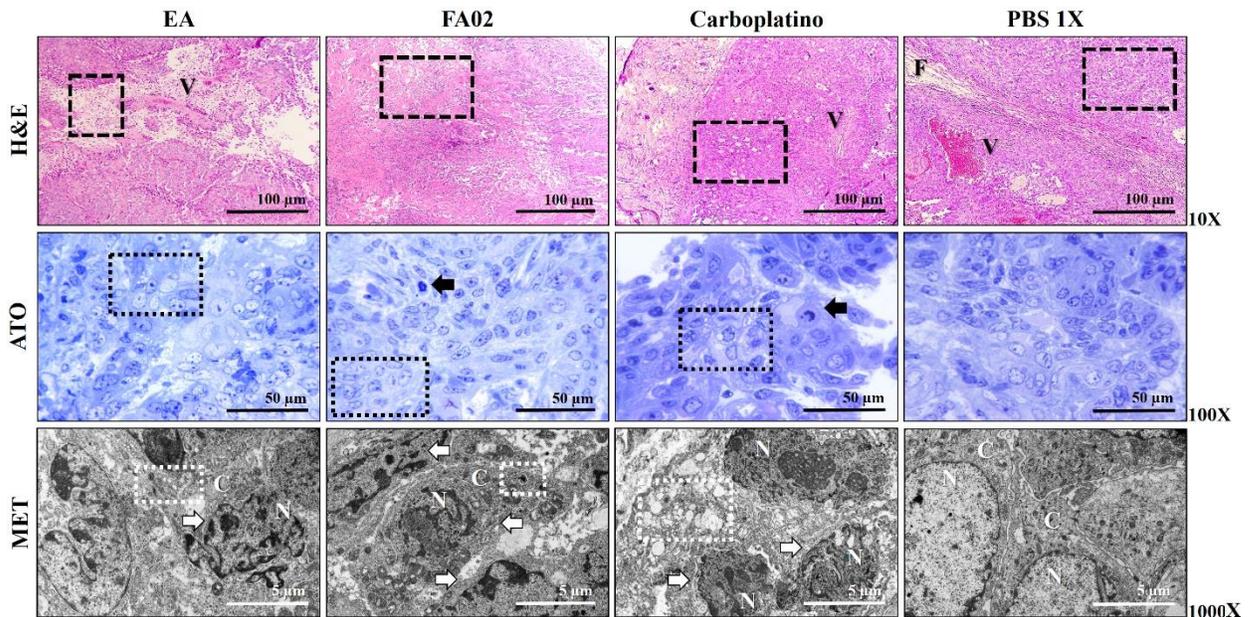


Figura 22. Análisis histopatológico a las lesiones tumorales de cáncer ovárico tratadas con el EA y la FA02 de RHTR. En la figura se pueden observar los patrones histológicos diferenciales, necrosis (recuadro en 10X), vascularidad (V), fibrosis (F), vacuolas citoplasmáticas posiblemente debidas a quiescencia celular (recuadros en 100X), mitosis atípicas (flechas en 100X), autofagia (recuadro en 1000X), núcleos con cromatina condensada en región apical (N) y reducción del citoplasma celular (C) posiblemente por apoptosis celular (flechas en 1000X). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5). Hematoxilina y eosina (HyE), azul de toluidina (ATO), microscopia electrónica de transmisión (MET).

órganos fue consistente con el grupo control que recibió vehículo (PBS 1X) (Figura 23A). En el análisis morfométrico (Tabla 12), se encontraron diferencias en el peso de los pulmones de 0.27 ± 0.035 g y del bazo de 0.12 ± 0.02 g en ratones expuestos a la FA02 durante los 28 días de tratamiento, por comparación con el grupo control ($p \leq 0.05$, ANOVA).

Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de los órganos en búsqueda de lesiones histopatológicas (Figura 23B y C). Sin embargo, en ninguno de los casos se presentaron diferencias con respecto al grupo control. En el bazo, se observó la cápsula y las trabéculas, así como parénquima esplénico formado por pulpa blanca y roja (10X), el corpúsculo de Malpighi, en el cual se distinguía la arteria central rodeada por el centro germinativo y linfocitos (40X). En los riñones, se presentó la corteza externa y la médula interna típicas (10X), con numerosos túbulos colectores en una trayectoria rectilínea y glo

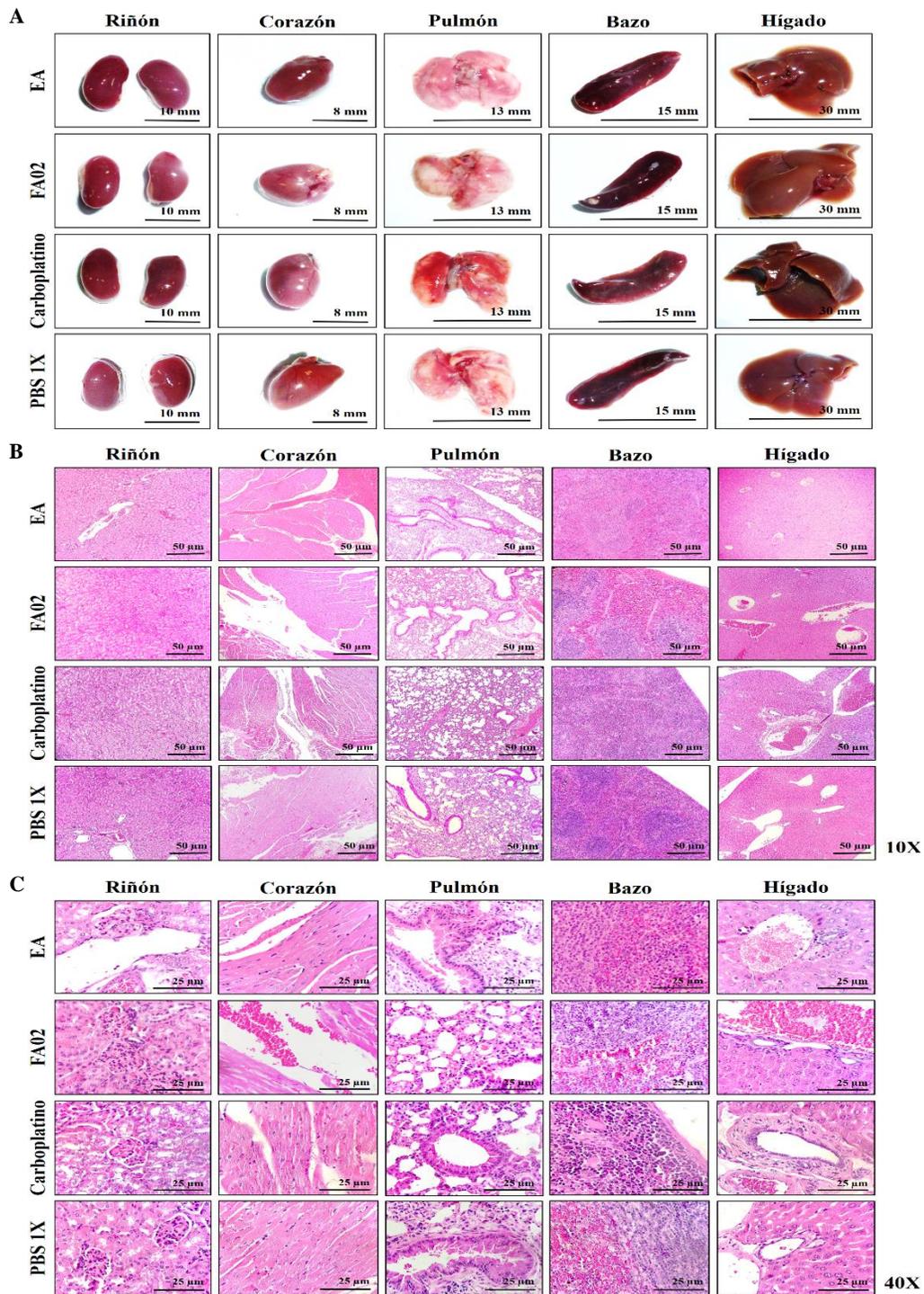


Figura 23. Análisis histopatológico de los órganos extraídos durante la evaluación toxicológica de los tratamientos con EA y FA02 de RHTR. En la figura se puede observar la morfología (A) y los patrones histológicos característicos del riñón, corazón, pulmón, bazo e hígado a 10X (B) y 40X (C) de aumento óptico. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5).

Tabla 12. Análisis morfométrico durante la evaluación toxicológica de EA y FA02 de RHTR.

Tratamiento	Determinación	Riñón	Corazón	Pulmón	Bazo	Hígado
EA	Peso (g)	0.38±0.048	0.15±0.023	0.23±0.04	0.14±0.03	1.48±0.22
	Diámetro largo (mm)	9.63±0.69	8.73±0.63	13.78±2.12	16.82±1.39	29.41±4.06
FA02	Peso (g)	0.40±0.06	0.16±0.014	0.27±0.035*	0.12±0.02*	1.61±0.15
	Diámetro largo (mm)	9.89±0.58	8.71±0.37	12.47±0.65	15.73±1.03	30.34±3.33
Carboplatino	Peso (g)	0.40±0.01	0.14±0.01	0.19±0.03*	0.18±0.02*	1.80±0.10*
	Diámetro largo (mm)	11.5±0.7*	8.5±0.7	11.5±2.1	18.5±0.7	30.5±2.2
PBS 1X	Peso (g)	0.38±0.042	0.16±0.026	0.24±0.041	0.15±0.01	1.53±0.14
	Diámetro largo (mm)	9.34±0.67	8.19±0.63	13.93±2.64	16.15±0.43	29.65±2.22

En la tabla, se muestra en rojo los valores superiores y en negritas los inferiores con respecto al grupo PBS 1X. Los resultados muestran la media ± D.E. de dos experimentos independientes (n = 5) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (PBS 1X) ($p < 0.05$, ANOVA).

mérulos renales rodeados por la cápsula de Bowman (40X). Los pulmones, presentaron la hoja visceral de la pleura rodeando al parénquima pulmonar, con algunos bronquios y bronquiólos, así como vasos sanguíneos de diferente calibre y espacios vacíos correspondientes a los sacos alveolares (10X) y finalmente la pared bronquial y la capa muscular (40X). El corazón, presentó numerosas fibras musculares cardiacas de tipo estriado, con un núcleo central y discos intercalares (40X), rodeadas de tejido conectivo y abundantes vasos sanguíneos (10X). En el hígado, se observó la tríada portal, compuesta por la vena porta, la arteria hepática y el conductillo biliar (10X y 40X). Con base en los resultados, se descartaron lesiones histológicas durante los tratamientos con RHTR.

Por último, en los estudios paraclínicos (Tabla 13) se observó una ligera leucopenia en ratones tratados con el EA de $3,600 \pm 903.4 \times 10^6/\text{mm}^3$ y la FA02 de $4,242.6 \pm 980.6 \times 10^6/\text{mm}^3$ ($p \leq 0.05$, ANOVA) a los 28 días de su administración con respecto a los valores de referencia para ratón. El análisis bioquímico, reveló una disminución de la albumina para el EA y la FA02 de $2.1 \pm 0.8 \text{ g/dL}$ y $2.03 \pm 0.35 \text{ g/dL}$ ($p \leq 0.05$, ANOVA) respectivamente, mientras el EA disminuyó adicionalmente la urea a $40.8 \pm 8.2 \text{ mg/dL}$ ($p \leq 0.05$, ANOVA) al finalizar el estudio.

Los resultados mostrados, sugieren una ligera supresión de la hematopoyesis en la médula ósea durante la administración del EA y la FA de RHTR, debido posiblemente al

Tabla 13. Estudios paraclínicos en la evaluación toxicológica de EA y FA02 de RHTR.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS					
Tratamientos	EA	FA02	Carboplatino	PBS 1X	REFERENCIA
Glucosa (mg/dL)	72 ± 23.9	114 ± 21.2*	107 ± 14.8*	78.3 ± 16.6	63-176 (89)
Triglicéridos (mg/dL)	71.5 ± 26.2	80 ± 11.35	103.7 ± 12.7*	87.6 ± 12.01	55-115 (85)
Colesterol (mg/dL)	66 ± 25.4*	62 ± 2.52*	108.6 ± 19.4*	85.5 ± 13.4	26-82 (64)
Proteínas (g/dL)	4.48 ± 0.6	4.42 ± 0.62	5.1 ± 1.46	4.7 ± 0.56	4-8.6 (6.2)
Albumina (g/dL)	2.1 ± 0.8*	2.03 ± 0.35*	1.33 ± 0.29	1.36 ± 0.21	2.5-4 (3.2)
AST (TGO) (U/L)	132.6 ± 45.7	145.7 ± 7.69	162.9 ± 8.2	149.8 ± 27.29	55-251 (139)
ALT (TGP) (U/L)	41.2 ± 9.8	32.43 ± 19.2	64.4 ± 6.87*	40.75 ± 14.5	17-77 (47)
Bilirrubina total (mg/dL)	0.47 ± 0.07*	0.39 ± 0.08*	0.58 ± 0.2	0.67 ± 0.16	0.20-1.0 (0.6)
Fosfatasa alcalina (U/L)	46.5 ± 23.2*	83.6 ± 24.04	66.6 ± 15.6	71 ± 10.36	9-88 (48.5)
Creatinina (mg/dL)	0.74 ± 0.4	0.7 ± 0.25	0.37 ± 0.26*	0.65 ± 0.2	0.2-0.9 (0.5)
Urea (mg/dL)	40.8 ± 8.2	57.6 ± 10.7	59.4 ± 9.99	47.9 ± 7.16	46.9-73 (60.1)
BUN (g/dL)	19 ± 3.8	26.8 ± 4.7	27.8 ± 4.63	22.36 ± 3.32	11-27 (19)
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS					
Hemoglobina (g/dL)	15.2 ± 0.98	12.35 ± 2.2	13.1 ± 1.61	14.4 ± 2.13	10-17 (13.1)
Hematocrito (%)	48.3 ± 7.92	43.6 ± 17.8	40.57 ± 4.16	44.52 ± 2.17	39-49 (40.4)
Eritrocitos (x 10 ⁶ /mm ³)	7.24 ± 1.06	7.67 ± 2.26	7.81 ± 0.88	7.92 ± 1.93	8.3
CMHG (%)	31.7 ± 3.25	29.7 ± 7.14	32.23 ± 2.68	33.46 ± 6.27	32.3
HCM (pg)	16.5 ± 0.84	16.3 ± 2.1	16.7 ± 0.78	16.87 ± 1.09	15.9
VCM (μL)	52.2 ± 2.62	55.9 ± 6.8	52.1 ± 2.12	56.2 ± 5.85	49.1
Leucocitos (x 100/mm ³)	3,600 ± 903.4*	4,242.6 ± 980.6	2,750 ± 777.82*	5,720 ± 684.6	5-12 (6.33)
RDW-CV	15.3 ± 1.41	14.05 ± 2.2	17.76 ± 2.15	16.5 ± 2.99	
RDW-SD	29.1 ± 1.83	25.2 ± 2.5	32.1 ± 5.17	33.84 ± 2.86	
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	736,000 ± 1,414.2	689,000 ± 5,425.8	759,666.7 ± 19,143.6	710,200 ± 6,716.5	116
MPV	7.2 ± 0.9	7.15 ± 0.9	7.3 ± 0.73	7.62 ± 1.25	
PDW	14.7 ± 1.3	14.3 ± 0.5	13 ± 0.85	13.8 ± 1.61	
PCT	0.53 ± 0.07	0.49 ± 0.10	0.55 ± 0.29	0.55 ± 0.30	
Linfocitos (%)	38 ± 3.74*	55 ± 8.38*	44.3 ± 11.3*	71 ± 14.8	35-90
Monocitos (%)	0	0	0	0	0-3
Eosinófilos (%)	0	0	0	0	0-7
Basófilos (%)	0	0	0	0	0-1
Neutrófilos segmentados (%)	12 ± 6.97	45 ± 8.38*	54.3 ± 9.4*	29 ± 4.8	10-40
Neutrófilos en banda (%)	0	0	4 ± 1.0	0	0
Formas inmaduras (%)	0	0	0	0	0

En la tabla se muestra en rojo los valores superiores y en negritas los inferiores con respecto a los valores de referencia para ratón. Los resultados muestran la media ± D.E. de dos experimentos independientes (n = 5) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (PBS 1X) (p < 0.05, ANOVA).

fenotipo altamente replicativo de las células sanguíneas [Adeneye y cols., 2006]; Sin embargo, los parámetros bioquímicos no revelaron disfunción hepática o insuficiencia renal, por lo cual podría considerarse el uso de RHTR en el tratamiento alternativo del cáncer ovárico.

9.8 Actividad antineoplásica de los principios activos de RHTR en ratones xenotrasplantados con SKOV-3.

Se evaluó la actividad antineoplásica del ácido gálico y la miricetina en ratones xeno-

trasplantados con células de cáncer SKOV-3, administrados vía peritumoral a una dosis de 50 mg/kg (2 días alternos/semana) durante 28 días, para determinar su efectividad en el tratamiento alternativo del cáncer ovárico. Durante su administración, no se observaron cambios de comportamiento en los roedores o signos de toxicidad, los cuales fueron evaluados durante las primeras horas del estudio.

Adicionalmente, se monitoreó el peso corporal de los roedores durante los 28 días de tratamiento, encontrándose una disminución del 7.4 % para el grupo tratado con ácido gálico, mientras un aumento del 1.4 % se presentó para los tratados con miricetina. Sin embargo, los cambios no resultaron significativos con respecto al grupo control tratado con vehículo DMSO al 10 % ($p > 0.05$, ANOVA) (Figura 24A).

Al finalizar los tratamientos, los roedores fueron sometidos a eutanasia para la recuperación de las lesiones tumorales, observándose macroscópicamente cambios en la forma, superficie y color de los tumores desarrollados (Figura 24B). En todos los grupos con tratamiento se presentaron tumoraciones ovoides, de superficie lisa, con aspecto sólido y vascularidad similar, así como diferencias en el color, el cual fue amarillo para ácido gálico y rosado para miricetina, mientras el grupo tratado con paclitaxel presentó una superficie esférica blanquecina y el vehículo una superficie nodular de coloración amarilla. Al analizar el peso de los tumores (Figura 24B), se observó mayor masa tumoral en los tratados con el vehículo, el cual fue de 0.68 ± 0.16 g, seguido por el grupo tratado con miricetina de 0.11 ± 0.06 g, posteriormente por el grupo con ácido gálico de 0.078 ± 0.04 g y finalmente el grupo de paclitaxel con 0.045 ± 0.01 g. Los resultados mostrados, correlacionan con el seguimiento del volumen tumoral de las lesiones presentes en los roedores (Figura 24C), observándose una disminución significativa a partir de los 7 a 28 días de tratamiento con ácido gálico, miricetina y paclitaxel, el cual fue del 48.3, 50 y 60.3 % respectivamente, por comparación con el grupo tratado con vehículo ($p \leq 0.05$, ANOVA).

Resultados similares, se encontraron al medir la longitud mayor de los tumores presentes en los distintos grupos de estudio posterior al tratamiento (Figura 24D); observándose en los ratones tratados con el vehículo 11.6 ± 0.57 mm, seguido del ácido gálico con 6.0 ± 2.0 mm, para miricetina con 5.8 ± 1.4 mm y por último los tratados con

paclitaxel de 4.6 ± 0.57 mm, demostrándose un efecto inhibitorio durante los tratamientos. Al comparar la longitud mayor inicial al tratamiento (Figura 24D), se demuestra una progresión estable de la enfermedad en los ratones tratados con ácido gálico y miricetina, al presentar un aumento del 11.6 y 3.4 % respectivamente ($p \leq 0.05$, ANOVA), mientras aquéllos tratados con el vehículo fue del 47.4 % y por último con paclitaxel, el cual presentó una disminución del 23.3 %.

9.8.1 Estudios de Imagenología por RMN y USG.

Se realizaron resonancias simples de cuerpo completo en decúbito supino y secuencias T1, T2 y STIR en reconstrucciones coronales (Figura 25A); observándose en todos los grupos tumores ovoides, localizados en tejido celular subcutáneo, los cuales presentaron bordes regulares y bien definidos, isointensos con relación a partes blandas en T1, hiperintensos y heterogéneos (a expensas de componente sólido y escaso líquido en su interior) en T2 y STIR. Mientras el grupo tratado con vehículo presentó mayor componente líquido relacionado posiblemente con la patología de la enfermedad. Finalmente, en todos los tratamientos se observó ausencia de procesos metastásicos.

Se complementó el estudio imagenológico con ultrasonografías, empleándose un transductor lineal multifrecuencia en imagen y tiempo real (Figura 25B), donde se corroboró la localización de las diferentes lesiones tumorales en el tejido celular subcutáneo y adicionalmente permitió su caracterización morfológica, observándose en los tratamientos con ácido gálico, miricetina y paclitaxel lesiones ovoides, con bordes regulares y bien definidos, de ecotextura heterogénea, con predominio de componente sólido, áreas difusas con relación a fibrosis y ausencia de vascularidad en modalidad *Doppler color y power*. Mientras el grupo tratado con vehículo presentó predominio de componente quístico, presencia de septos en su interior y vascularidad central.

9.8.2 Análisis histopatológicos de las lesiones tumorales tratadas con ácido gálico y miricetina.

El análisis histológico a las lesiones presentes en los roedores (Figura 26), reveló estroma neoplásico medular de composición mixta, con patrón sólido de tipo comedo para ácido gálico, miricetina y paclitaxel, debido a la presencia de amplia necrosis central,

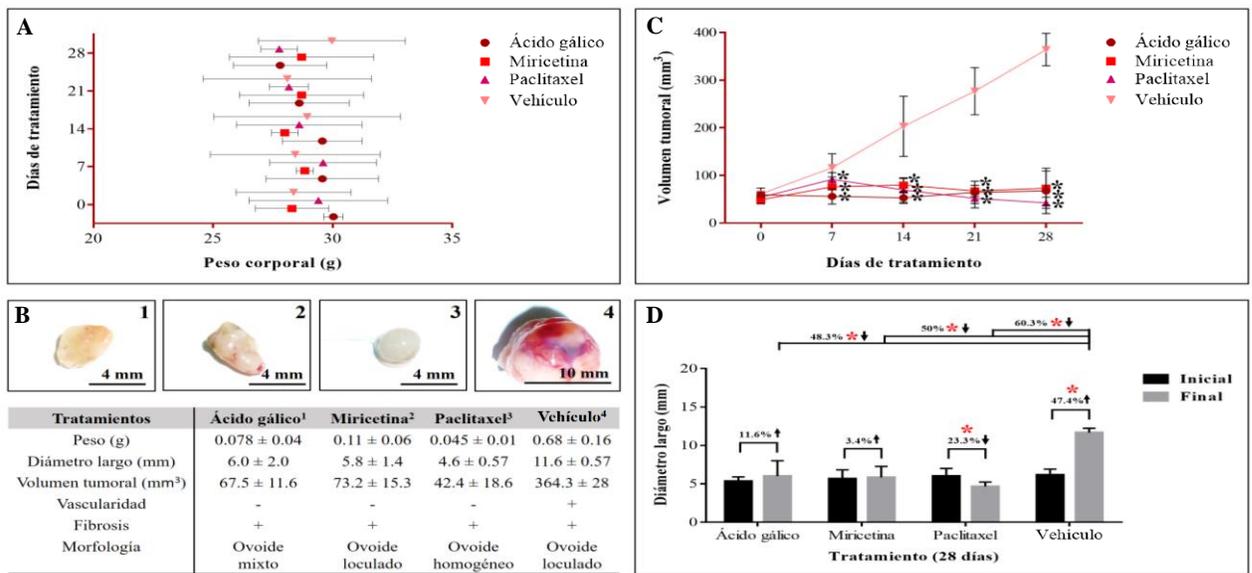


Figura 24. Actividad antineoplásica del ácido gálico y la miricetina en lesiones tumorales de cáncer ovárico. Peso corporal de roedores durante los tratamientos (A). Características y cambios morfológicos en las lesiones tumorales al finalizar los tratamientos (B). Volumen tumoral de las lesiones durante los 28 días de tratamiento con ácido gálico y miricetina a 50 mg/kg (2 días alternos/semana) vía peritumoral (C). Porcentaje de inhibición de cada tratamiento con base en el volumen tumoral final con respecto al grupo control y la evolución de la enfermedad durante cada tratamiento con el diámetro inicial vs final (D). Los resultados muestran la media ± D.E. de dos experimentos independientes (n = 5). (*) Diferencias significativas con respecto al control de ratones tratados con vehículo (DMSO al 10 %) ($p \leq 0.05$, ANOVA).

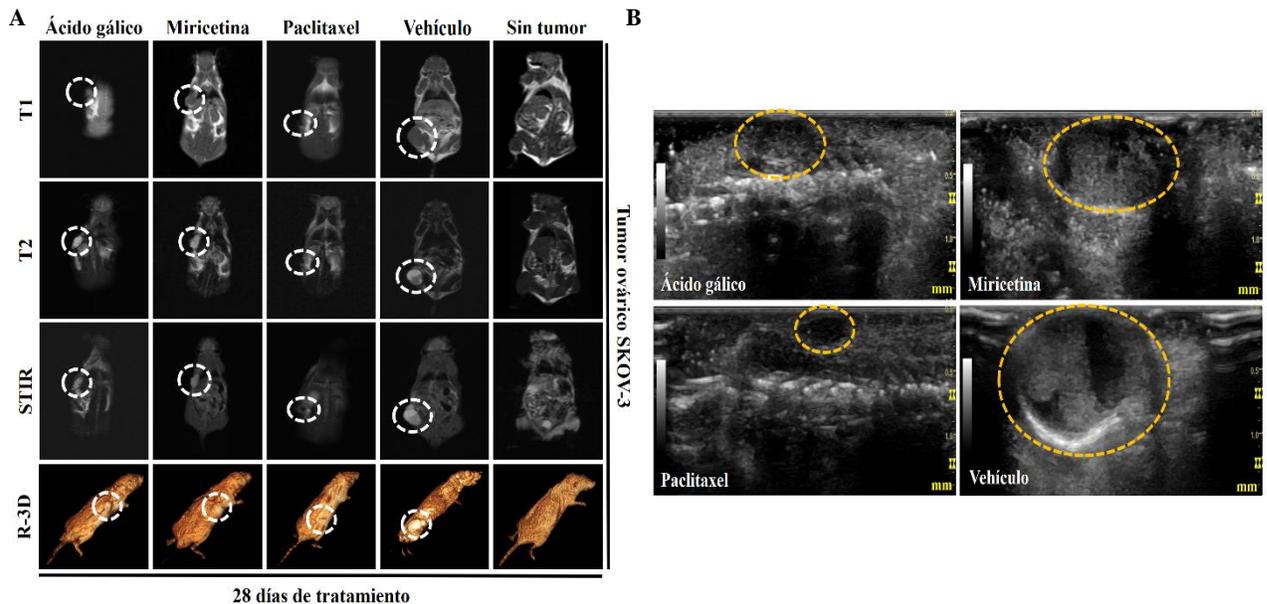


Figura 25. Correlación imagenológica de la actividad antineoplásica del ácido gálico y la miricetina en lesiones tumorales de cáncer ovárico. Se realizó RMN (A) y USG (B) para observar cambios densimétricos y morfológicos en las lesiones tumorales, así como descartar procesos metastásicos durante los tratamientos. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5).

la cual se encuentra rodeada por infiltrado leucocitario, con retracción estromal, presencia de fibrosis, disminución de la vascularidad e inducción de apoptosis. Mientras las lesiones tratadas con vehículo presentaron un patrón desmoplásico y microquístico, el cual se caracteriza por abundante fibrosis en banda, adherencias y pérdida de estroma neoplásico, así como mayor vascularización peritumoral, he indicios de inflamación aguda a crónica moderada sin observar órgano residual, las cuales son características que corresponden a carcinomas de tipo seroso papilar.

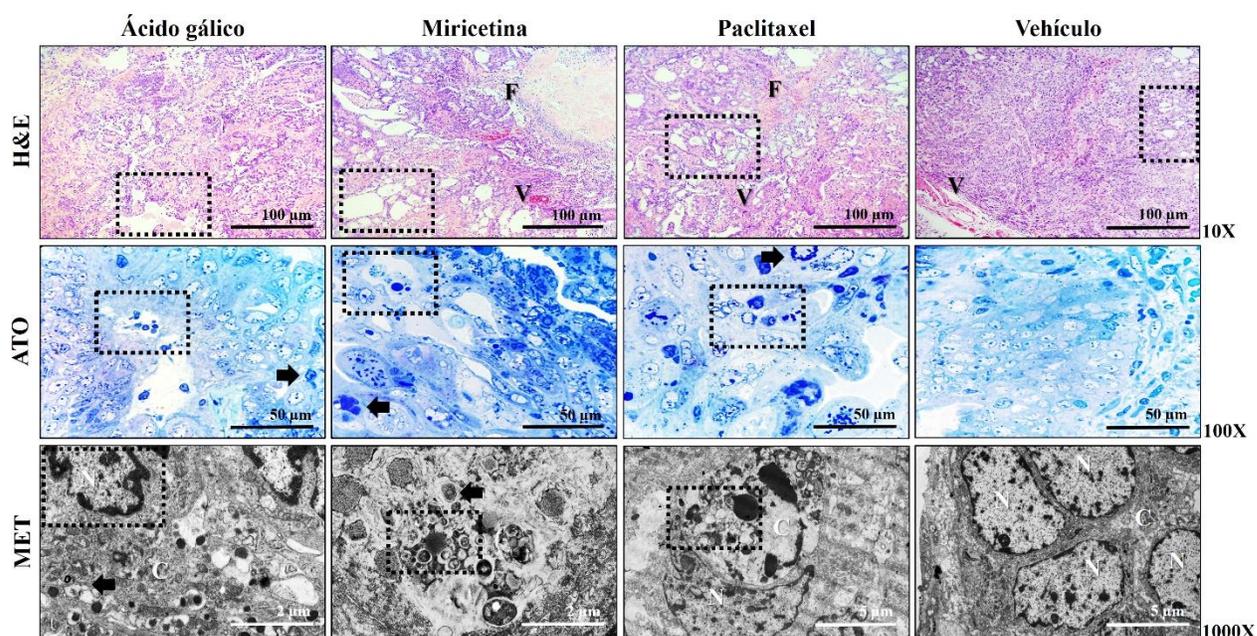


Figura 26. Análisis histopatológico a las lesiones tumorales de cáncer ovárico tratadas con ácido gálico y miricetina. En la figura, se puede observar patrones histológicos diferenciales, necrosis (recuadro en 10X), vascularidad (V), fibrosis (F), apoptosis (recuadros en 100X), cuerpos picnóticos (recuadros en 1000X), mitosis atípicas (flechas en 100X), autofagia (flechas en 1000X), núcleos (N) y citoplasma celular (C). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5). Hematoxilina y eosina (HyE), azul de toluidina (ATO), microscopia electrónica de transmisión (MET).

9.8.3 Evaluación toxicológica durante los tratamientos con ácido gálico y miricetina.

Al finalizar los tratamientos, los ratones se anestesiaron para la obtención de muestras sanguíneas y la realización de las disecciones correspondientes. Con este fin, se llevó a cabo la observación anatómica del hígado, corazón, bazo, pulmones y riñones

en búsqueda de lesiones patológicas (Figura 27A). Sin embargo, la morfología de los órganos fue consistente con el grupo control que recibió vehículo (DMSO al 10 %). En el análisis morfométrico (Tabla 14), se encontraron diferencias en el peso y diámetro del bazo de 0.2 ± 0.05 g y 23.6 ± 4.7 mm respectivamente, así como en el peso del hígado de 2.1 ± 0.2 g en ratones tratados con ácido gálico, mientras el peso del bazo y el diámetro de los pulmones fue de 0.18 ± 0.01 g y 11.6 ± 1.5 mm para el grupo tratado con paclitaxel, durante los 28 días de tratamiento por comparación con el grupo vehículo ($p \leq 0.05$, ANOVA).

Tabla 14. Análisis morfométrico durante la evaluación toxicológica de ácido gálico y miricetina.

Tratamiento	Determinación	Riñón	Corazón	Pulmón	Bazo	Hígado
Ácido gálico	Peso (g)	0.5 ± 0.08	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.08	$0.2 \pm 0.05^*$	$2.1 \pm 0.2^*$
	Diámetro largo (mm)	13.3 ± 2.08	10.6 ± 0.6	16.3 ± 2.1	$23.6 \pm 4.7^*$	31.3 ± 2.1
Miricetina	Peso (g)	0.44 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.09	0.15 ± 0.03	1.87 ± 0.14
	Diámetro largo (mm)	10.6 ± 0.6	9 ± 0.5	15.6 ± 1.5	21 ± 3.6	32 ± 1.7
Paclitaxel	Peso (g)	0.4 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.2 ± 0.01	$0.18 \pm 0.01^*$	1.8 ± 0.006
	Diámetro largo (mm)	11 ± 1.0	9 ± 1.0	$11.6 \pm 1.5^*$	18.6 ± 0.6	30.3 ± 1.5
Vehículo	Peso (g)	0.34 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.2 ± 0.03	0.15 ± 0.03	1.6 ± 0.04
	Diámetro largo (mm)	12 ± 1.0	10.6 ± 1.5	16 ± 2.0	20 ± 2.0	30.3 ± 2.5

En la tabla, se muestra en rojo los valores superiores y en negritas los inferiores con respecto al grupo PBS 1X. Los resultados muestran la media \pm D.E. de dos experimentos independientes ($n = 5$) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (PBS 1X) ($p < 0.05$, ANOVA).

Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de los órganos en búsqueda de lesiones histopatológicas (Figura 27B y C); observándose en aumento 10X, el estroma característico de cada uno de los órganos, mientras a 40X puede apreciarse la pérdida de parénquima hepático e infiltrado leucocitario en el grupo de ácido gálico, así como indicios de inflamación aguda a crónica moderada en hígado y riñón del grupo que recibió paclitaxel, las cuales fueron diferencias morfológicas ausentes en el grupo tratado con el vehículo o miricetina.

Por último, durante la administración de los diferentes tratamientos se observaron cambios en los valores bioquímicos y hematológicos con respecto al grupo control de vehículo o los valores de referencia reportados para ratón (Tabla 15), al encontrarse una ligera leucopenia en ratones tratados con ácido gálico y miricetina de $3,466.7 \pm 1,050.4$

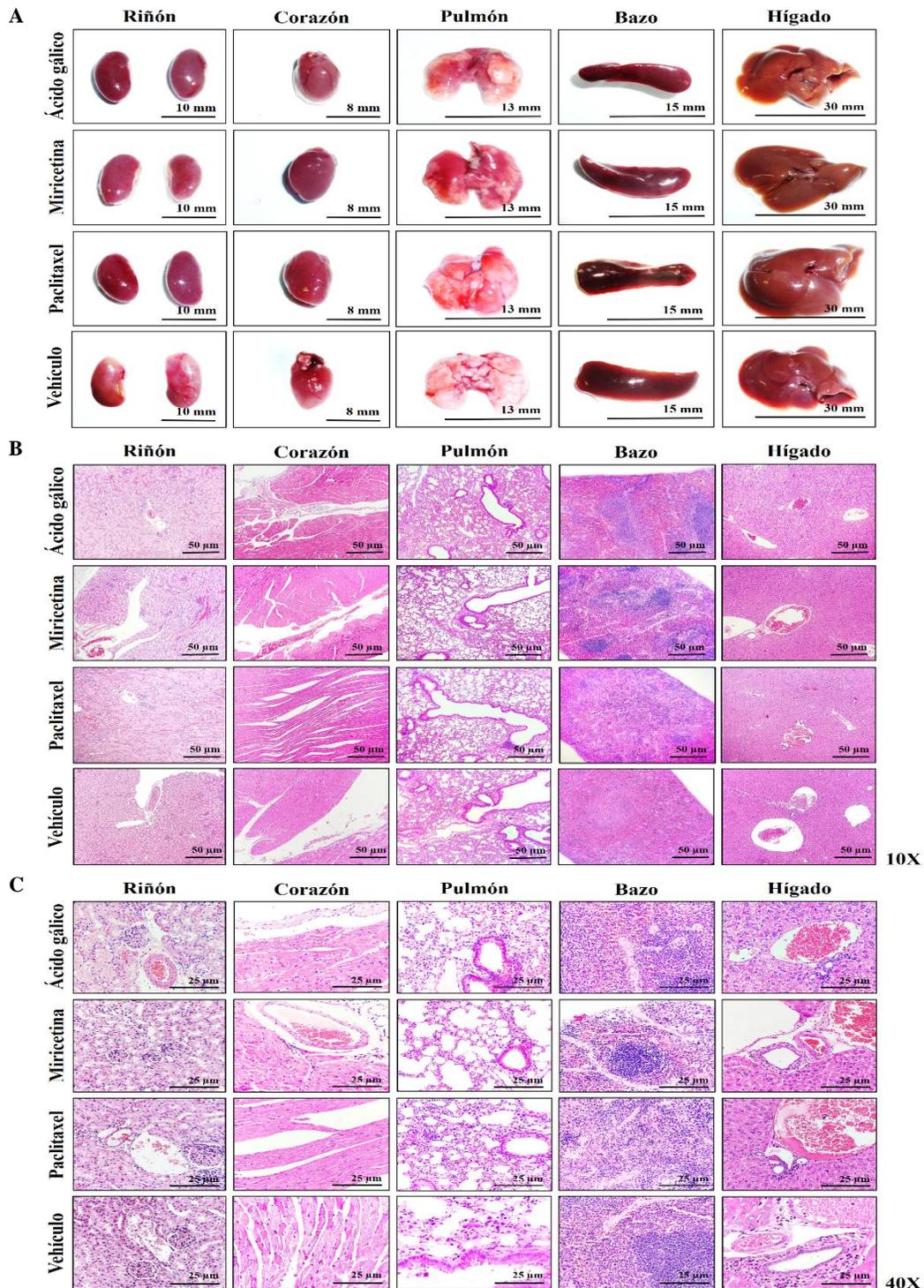


Figura 27. Análisis histopatológico de los órganos extraídos durante la evaluación toxicológica de los tratamientos con ácido gálico y miricetina. En la figura se puede observar la morfología (A) y los patrones histológicos característicos del riñón, corazón, pulmón, bazo e hígado a 10X (B) y 40X (C) de aumento óptico. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 5).

Tabla 15. Estudios paraclínicos durante la evaluación toxicológica de ácido gálico y miricetina.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS					
Tratamientos	Ácido gálico	Miricetina	Paclitaxel	Vehículo	REFERENCIA
Glucosa (mg/dL)	65.3 ± 9.9	71.7 ± 18.9	83.6 ± 15.2*	45.0 ± 10.6	63-176 (89)
Triglicéridos (mg/dL)	62.3 ± 28.7	103.3 ± 32.5*	122.0 ± 9.2*	80.6 ± 12.01	55-115 (85)
Colesterol (mg/dL)	47.0 ± 8.5	56.6 ± 15.3	52.0 ± 15.6	29.0 ± 16.5	26-82 (64)
Proteínas (g/dL)	5.5 ± 0.9	5.5 ± 0.24	6.0 ± 0.64	4.9 ± 0.6	4-8.6 (6.2)
Albumina (g/dL)	1.16 ± 0.2	1.16 ± 0.29	1.33 ± 0.3	1.30 ± 0.3	2.5-4 (3.2)
AST (TGO) (U/L)	162.1 ± 21.6	152.5 ± 20.0	168.8 ± 1.9	152.4 ± 32.8	55-251 (139)
ALT (TGP) (U/L)	150.7 ± 25.6*	56.8 ± 20.0	66.3 ± 3.7	52.5 ± 24.4	17-77 (47)
Bilirrubina total (mg/dL)	0.7 ± 0.08	0.46 ± 0.02*	0.82 ± 0.3	0.63 ± 0.18	0.20-1.0 (0.6)
Fosfatasa alcalina (U/L)	16.0 ± 1.73*	40.0 ± 5.0*	73.3 ± 6.6	66.3 ± 5.5	9-88 (48.5)
Creatinina (mg/dL)	0.41 ± 0.1*	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.2-0.9 (0.5)
Urea (mg/dL)	33.4 ± 7.4	49.2 ± 6.7	63.7 ± 7.7*	46.7 ± 6.6	46.9-73 (60.1)
BUN (g/dL)	13.3 ± 1.4*	16.9 ± 3.3	30.3 ± 3.8*	21.8 ± 3.1	11-27 (19)
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS					
Hemoglobina (g/dL)	12.6 ± 1.04	12.8 ± 2.2	14.2 ± 2.1	13.5 ± 2.3	10-17 (13.1)
Hematocrito (%)	38.4 ± 3.05	36.2 ± 6.7	41.8 ± 5.4	36.5 ± 5.8	39-49 (40.4)
Eritrocitos (x 10 ⁶ /mm ³)	7.38 ± 0.84	6.64 ± 1.5	7.2 ± 1.4	6.7 ± 1.5	8.3
CMHG (%)	32.8 ± 1.14	35.4 ± 0.25	34.0 ± 0.7	37.0 ± 4.5	32.3
HCM (pg)	17.2 ± 1.92	19.6 ± 3.6	17.2 ± 0.15	20.5 ± 5.2	15.9
VCM (μL)	52.5 ± 7.45	55.4 ± 9.84	50.7 ± 0.9	54.7 ± 6.9	49.1
Leucocitos (x 100/mm ³)	3,466 ± 1,050*	3,766 ± 1,644*	5,266 ± 1,903	6,666 ± 1,026	5-12 (6.33)
RDW-CV	20.9 ± 8.03	21.0 ± 6.6	18.2 ± 1.4	17.7 ± 3.0	
RDW-SD	30.4 ± 1.45	40.4 ± 8.9	33.5 ± 2.6	30.9 ± 4.3	
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	863.0 ± 43.14	1,071.3 ± 244.8	884.0 ± 206.8	846.3 ± 270.75	116
MPV	7.6 ± 2.3	8.7 ± 2.4	6.7 ± 0.8	7.4 ± 1.6	
PDW	16.6 ± 4.3	19.1 ± 1.7*	13.4 ± 1.4	13.7 ± 2.3	
PCT	0.66 ± 0.19	0.96 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.4	
Linfocitos (%)	47.3 ± 11.0*	66.3 ± 17.9	60.0 ± 8.7	68 ± 8	35-90
Monocitos (%)	0	0	0	0	0-3
Eosinófilos (%)	0	0	0	0	0-7
Basófilos (%)	0	0	0	0	0-1
Neutrófilos segmentados (%)	52.6 ± 11.0*	32.6 ± 9.6	40.0 ± 8.7	32 ± 8	10-40
Neutrófilos en banda (%)	0	0	0	0	0
Formas inmaduras (%)	0	0	0	0	0

En la tabla se muestra en rojo los valores superiores y en negritas los inferiores con respecto a los valores de referencia para ratón. Los resultados muestran la media ± D.E. de dos experimentos independientes (n = 5) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (DMSO 10 %) ($p < 0.05$, ANOVA).

x10⁶/mm³ y 3,766.6 ± 1,644.2 x10⁶/mm³ ($p \leq 0.05$, ANOVA) respectivamente, así como la presencia de neutrofilia en el grupo con ácido gálico del 52.6 %, lo cual puede estar relacionado con una inflamación crónica y correlacionarse con el infiltrado leucocitario observado en el hígado durante el análisis histológico. Adicionalmente, el ácido gálico causó una hipertransaminasemia, al aumentar los niveles sanguíneos de AST hasta 150.7 ± 25.60 U/L ($p \leq 0.05$, ANOVA) posiblemente a causa de una hepatitis crónica y una disminución en los niveles de urea y BUN de 33.4 ± 7.4 mg/dL y 13.3 ± 1.4 g/dL ($p \leq 0.05$, ANOVA) respectivamente, los cuales se relacionan con una insuficiencia o necrosis

hepática y se correlacionan con la pérdida de parénquima hepático reportado previamente en los hallazgos histopatológicos. Por último, el paclitaxel aumentó la concentración plasmática de urea en 30.3 ± 3.8 g/dL ($p \leq 0.05$, ANOVA), lo cual puede estar relacionado con una insuficiencia renal y correlacionarse con el infiltrado leucocitario observado en los riñones durante el análisis histológico.

Los resultados mostrados, sugieren un efecto toxicológico crónico durante la administración de ácido gálico, el cual puede estar relacionado con la concentración del fármaco utilizado durante el estudio. Sin embargo, la miricetina no causó alteraciones histopatológicas o bioquímicas durante su uso, por lo cual podría utilizarse en el tratamiento alternativo o complementario del cáncer ovárico.

9.9 Efecto citológico de ácido gálico y miricetina en SKOV-3.

Estudios recientes, han demostrado la capacidad de los polifenoles para inducir una respuesta antioxidante en las células, a través de la generación de ERO, los cuales pueden actuar como segundos mensajeros y modular la actividad de diversos procesos relacionados con el citoesqueleto, el ciclo y la muerte celular.

Por tanto, se realizó la determinación de ERO intracelular en SKOV-3 al finalizar los tratamientos con ácido gálico y miricetina (Figura 28A), encontrándose un incremento del 42 y 34 % respectivamente, en comparación al 3.5 % observado para el grupo control de vehículo (DMSO al 10 % en PBS 1X) ($p \leq 0.05$, ANOVA). Adicionalmente, se observaron cambios en la morfología celular (Figura 28B), como redondeamiento, individualización, condensación del citoplasma y de la cromatina nuclear, disminución de mitocondrias, engrosamiento del retículo endoplasmático y alteraciones en la membrana nuclear, los cuales son indicativos de una posible activación del proceso apoptótico.

Para corroborarlo, se utilizó la AnV para evidenciar la externalización de la fosfatidilserina en la membrana celular durante la apoptosis y el IP para visualizar alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática como el producido durante la necrosis (Figura 28C), encontrándose un incremento en la apoptosis para ácido gálico, miricetina y paclitaxel del 18.9, 26.6 y 36.3 % respectivamente, mientras en la necrosis se observó un aumento gradual del 8.1, 15.1 y 30.8 % para los mismos compuestos, con

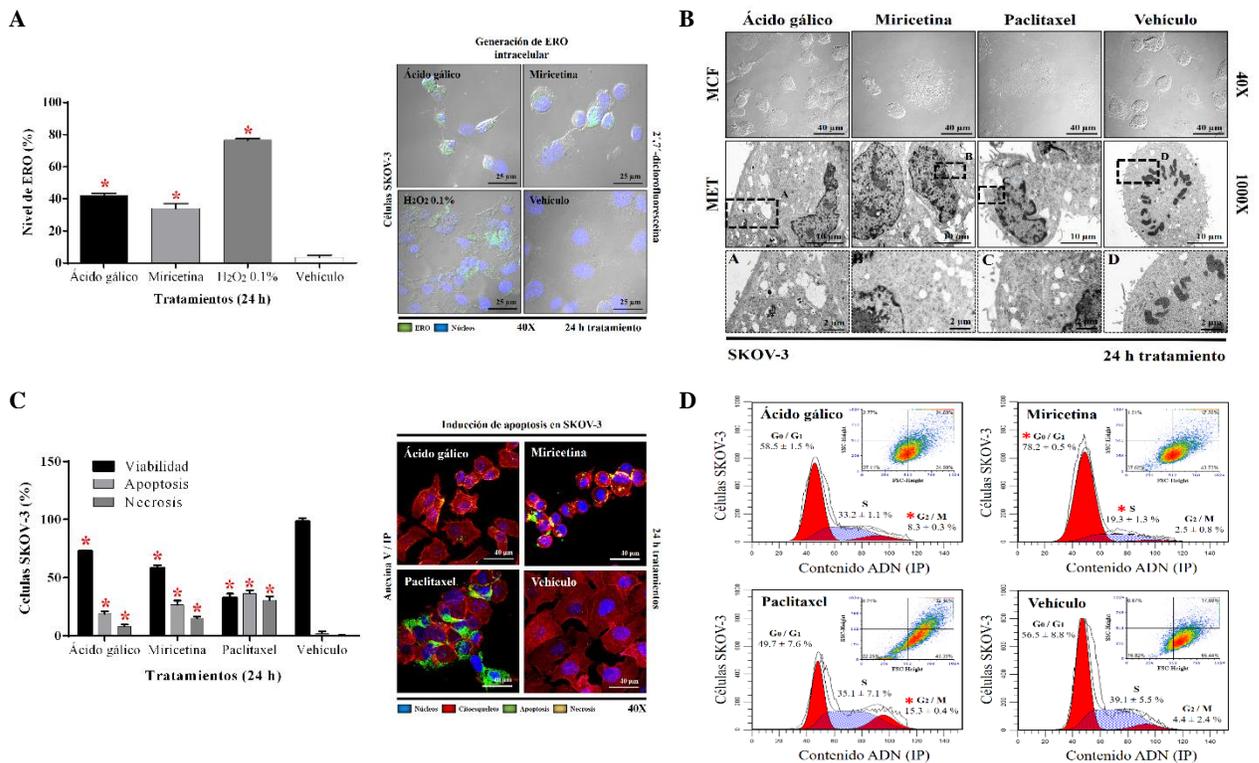


Figura 28. Efecto biológico del ácido gálico y la miricetina en células SKOV-3 durante 24 h de tratamiento. Se utilizó la Cl_{50} del ácido gálico y la miricetina, para determinar la generación de ERO intracelular mediante $25 \mu\text{M}$ de la sonda $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ (A), la observación de cambios morfológicos por microscopia de contraste de fase (MCF) y en la ultraestructura celular mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) (B), la inducción de apoptosis por la externalización de la fosfatidilserina en la membrana celular con AnV-FITC, así como necrosis por cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática con $250 \mu\text{g/mL}$ de IP y finalmente el análisis del ciclo celular mediante 1 mg/mL de IP ($G_0/G_1:2n$, $S:2/4n$ y $G_2/M:4n$). Los resultados muestran la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado ($n = 9$) y (*) cambios significativos por comparación con el grupo control de vehículo (DMSO al 10 % en PBS 1X) ($p < 0.05$, ANOVA).

respecto a las células tratadas con el vehículo ($p \leq 0.05$, ANOVA), relacionado posiblemente con el comienzo de la apoptosis tardía.

Estudios recientes, han demostrado que las ERO son capaces de inducir desarreglos en la red de microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto celular, el cual participa en diversas funciones importantes como soporte, transporte, tráfico y división celular. Por tanto, se llevó a cabo el análisis por ensayos de IHF, para observar cambios en la estructuración de la actina y tubulina presentes en SKOV-3, durante los tratamientos con ácido gálico y miricetina (Figura 29). Los resultados obtenidos, revelaron una

acumulación de actina polimerizada, así como una disminución de las prolongaciones membranales y de los filamentos de actina durante los tratamientos con ácido gálico, miricetina y paclitaxel. Subsecuentemente, la tubulina se encontró polimerizada en acúmulos durante los diferentes tratamientos a excepción del grupo con vehículo. Adicionalmente, la miricetina y el paclitaxel estabilizaron la red de microtúbulos, impidiéndose su desensamblaje, así como la segregación cromosómica y la división celular.

Para confirmarlo, se estudió el efecto de los tratamientos en el ciclo celular (Figura 28D), observándose con la miricetina un incremento de la fase G_0/G_1 del 78 %, mientras el ácido gálico y el paclitaxel aumentaron la fase G_2/M en 8.3 y 15.3 % respectivamente, con respecto a las células tratadas con el vehículo ($p \leq 0.05$, ANOVA), lo cual correlaciona con los efectos observados en el citoesqueleto celular.

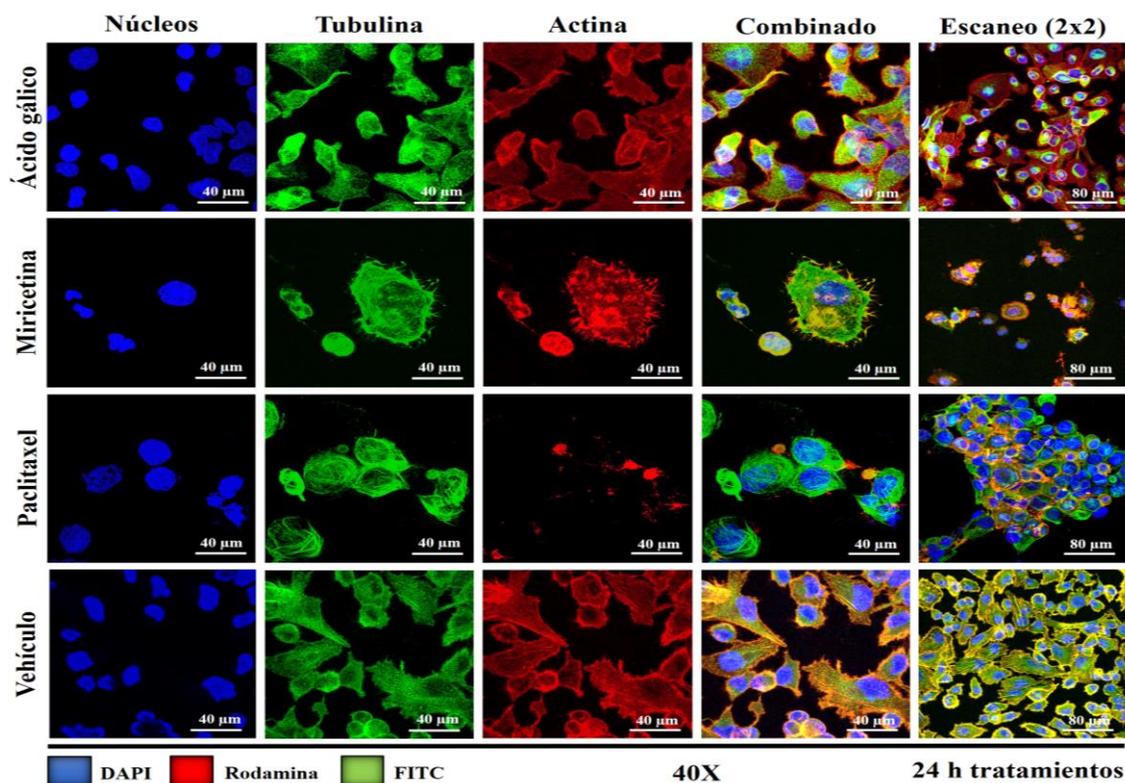


Figura 29. Cambios morfológicos en el citoesqueleto celular de SKOV-3 durante los tratamientos con ácido gálico y la miricetina. Los cambios se observaron por IHF con faloidina-rhodaminada (actina filamentosa), anticuerpo α/β -tubulina/IgG-FITC (tubulina) y DAPI (núcleos) a las 24 h de tratamiento. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado ($n = 9$).

10. DISCUSIÓN.

Las plantas son capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos como alcaloides, terpenoides y polifenoles, los cuales pueden desempeñar un papel importante en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas las neoplásicas [Sang-Bong y Hae-Ryong, 2010]. Se ha demostrado que el género *Rhus* posee una alta concentración de compuestos fenólicos como el ácido gálico, entre otros galatos y de flavonoides como la fustina, quercetina, buteína y sulfuretina, los cuales se han identificado en *R. verniciflua*, *R. succedanea* y *R. coriaria*, confiriéndoles actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antiparasitaria y antineoplásica, [Rayne y Mazza, 2007].

Los resultados obtenidos en este estudio se correlacionan con la información presentada para *Rhus* spp. El análisis de la composición fitoquímica del EA de RHTR, reveló que los compuestos más abundantes fueron polifenoles y flavonoides, los cuales se encontraron inclusive a una concentración similar a la observada en el té verde (*Camellia sinensis*) [Jungmin y cols., 2012]. El compuesto que presentó una mayor abundancia fue el β -PGG, el cual es un galotanino hidrolizable utilizado para la obtención de galatos contra diferentes factores de estrés [Shin y cols., 2017; Gross, 1992]. Adicionalmente, estudios recientes demuestran la capacidad del β -PGG para inducir la muerte celular en líneas celulares provenientes de cáncer de pulmón (LLC, 75 μ M), próstata (TRAMP, 25 μ M) e hígado (SK-HEP-1, 30 μ M) [Hu y cols., 2008].

Ensayos realizados *in vitro* con líneas celulares de cáncer y normales, demostraron que el EA de RHTR es capaz de inhibir la proliferación celular en SKOV-3 a 50 μ g/mL, mientras en CHO-K1 y BEAS-2B fue necesario un aumento en la concentración hasta 600 μ g/mL para observar un resultado similar, lo que sugiere un efecto citostático y selectivo de los compuestos presentes. Al evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas y su composición metabólica, se observó que la FA02 conservó la actividad del extracto crudo original y presentó una abundancia de los compuestos quercetina, fisetina, amentoflavona y miricetina, así como de algunas variantes glicosiladas. Por lo cual, estos

compuestos podrían estar relacionados con las propiedades medicinales que presenta RHTR contra el cáncer.

Estudios realizados por distintos grupos de investigación, han demostrado que la fisetina es un compuesto capaz de detener el ciclo celular en la fase G₁ en células de adenocarcinoma de colon y posteriormente activar la apoptosis independiente de p53 [Bhat y cols., 2012], mientras la quercetina, ha presentado citotoxicidad selectiva y actividad apoptótica en diversas líneas celulares de cáncer humano, tales como CACO-2 y HepG2 en comparación con las líneas celulares normales [Maiyo y cols., 2016] y la miricetina ha logrado inhibir la proliferación celular, la migración y posteriormente inducir apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer [Murayyan et al., 2017].

Al llevar a cabo ensayos en SKOV-3, para determinar el efecto celular de los compuestos anteriormente mencionados, se demostró que el ácido gálico y la miricetina son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis a una concentración de 50 µg/mL y 166 µg/mL respectivamente, al igual que alteraciones en la morfología celular al presentarse acúmulos de actina polimerizada y una estabilización de la tubulina, así como una detención del ciclo celular en G₁ por miricetina y en G₂ por ácido gálico. Dichos efectos, parecen estar relacionados con la generación de ERO, ya que diversos estudios han demostrado que pueden actuar como segundos mensajeros y modular la actividad de procesos que involucran al citoesqueleto, el ciclo y la muerte celular [Badhani y cols., 2015; Devi y cols., 2015]. Adicionalmente, ensayos *in silico* demostraron que el ácido gálico es capaz de inhibir a la anhidrasa carbónica, la cual es una metaloenzima dependiente de zinc encargada de regular el pH intracelular, al catalizar la conversión de CO₂ y H₂O en HCO₃, mientras la miricetina parece inhibir las tirosinasas como PIK3 y estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto celular. Estudios recientes, han demostrado el papel fundamental de la anhidrasa carbónica en diferentes patologías gastrointestinales, renales, ósea, pulmonares e inclusive el cáncer, debido a su amplia distribución tisular [Espinosa y Sierra, 2010], mientras estudios realizador por Quiñonez y cols. (2013), encontraron que la anhidrasa carbónica se encuentra muy abundante en el cáncer ovárico a diferencia de otros tipos de cáncer como el renal. Así mismo, se ha observado que el cáncer de ovario es muy sensible al efecto de diversos compuestos que

actúan sobre el citoesqueleto celular como el paclitaxel [Alonso, 2009]. Por tanto, estos hallazgos demuestran que el ácido gálico y la miricetina podrían tener un papel importante en el tratamiento alternativo del cáncer de ovario.

Ensayos realizados *in vivo* con ratones xenotrasplantados con cáncer de ovario, demostraron un crecimiento desigual de las masas tumorales que fueron tratadas con el EA y la FA02 en relación con el control de vehículo PBS 1X, al presentarse una reducción del 37.6 y 48.9 % respectivamente, mientras el tumor con vehículo triplicó su tamaño durante todos los ensayos. Sin embargo, al llevar a cabo un análisis de las longitudes mayores del tumor, al inicio y al final del estudio, se observó una progresión de la enfermedad en los ratones tratados con RHTR, mientras el control con carboplatino presentó un desarrollo estable de la enfermedad, lo cual demuestra un efecto citostático en ambos casos. Adicionalmente, al evaluar la actividad del ácido gálico y la miricetina en las lesiones tumorales, se logró apreciar una inhibición significativa a partir de la primera semana de tratamiento, el cual alcanzó su valor máximo al finalizar la cuarta semana con 48.3 y 50 % respectivamente, observándose una similitud con el control de paclitaxel del 60.3 %, debido a la inducción de un proceso apoptótico durante los tratamientos.

El análisis histológico, demostró que todas las lesiones tumorales presentes en los roedores se clasifican como de alto grado, las cuales se asocian con un mal pronóstico y son de difícil tratamiento en la práctica clínica según las guías internacionales [NCCN, 2016]. A la fecha, el tratamiento de primera elección para el cáncer de ovario con un grado de anaplasia IV es la combinación de paclitaxel:carboplatino, ya que ambos compuestos presentan diferencias en su mecanismo de acción [Gallardo-Rincón y cols., 2006]. El carboplatino, es capaz de generar aductos en el ADN para impedir la proliferación celular [Micetick y cols., 1985] y el paclitaxel, puede unirse a la subunidad beta de la tubulina para estabilizar los microtúbulos y bloquear la mitosis, lo cual desencadena la muerte celular por apoptosis [Barrales-Cureño y Soto-Hernández, 2011]. Por tanto, la similitud en el efecto del EA, FA02, ácido gálico y miricetina, con los fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer ovárico, los vuelve candidatos idóneos para el tratamiento de esta enfermedad.

Finalmente, los roedores no presentaron cambios de comportamiento o signos de toxicidad durante los diferentes tratamientos. Las determinaciones morfométricas, histopatológicas y paraclínicas realizadas durante las necropsias, no revelaron cambios anatómicos ni lesiones histológicas en los órganos recuperados o modificaciones significativas en los parámetros bioquímicos y hematológicos durante los tratamientos con EA, FA02 y miricetina con respecto al control. Sin embargo, los ratones tratados con ácido gálico presentaron necrosis hepática e infiltrado leucocitario, el cual fue evidenciado en el análisis histológico. Así mismo, se observó una hipertransaminasemia por AST de 150.7 ± 25.60 U/L y una disminución en los niveles de urea y BUN de 33.4 ± 7.4 mg/dL y 13.3 ± 1.4 g/dL respectivamente, los cuales se relacionan con indicios de una insuficiencia hepática a causa de una inflamación crónica producida por la pérdida de parénquima hepático, por comparación con el grupo control y los valores de referencia para ratón.

Estudios toxicológicos realizados para *R. verniciflua*, demostraron que la administración oral del EA en ratones, a 5,000 mg/kg en dosis repetidas durante 90 días, no presenta efectos letales o adversos en sus signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos, alteraciones anatómicas o histológicas en órganos, así como en los análisis paraclínicos durante el ensayo [Shin y cols., 2013], lo cual demuestra la baja toxicidad que presenta el género *Rhus* durante su consumo. Adicionalmente, estudios de toxicidad subcrónica realizados para el ácido gálico en ratas F344, las cuales fueron alimentadas con una dieta que contenía 5 % del compuesto por 13 semanas, revelaron una disminución del peso corporal y el desarrollo de una anemia hemolítica, así como una hipertrofia de las células hepáticas centrilobulares y cambios en el epitelio tubular proximal del riñón, por lo cual puede considerarse moderadamente tóxico [Niho y cols., 2001].

Los resultados mostrados, sugieren un efecto toxicológico crónico durante la administración de ácido gálico, el cual puede estar relacionado con la concentración del fármaco utilizado durante el estudio. Sin embargo, la miricetina no presentó alteraciones histopatológicas o bioquímicas durante su uso, por lo cual podría utilizarse en el tratamiento alternativo del cáncer ovárico.

11. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la actividad antineoplásica de RHTR, en roedores xenotrasplantados con cáncer de ovario a 200 mg/kg/día vía intraperitoneal, al reducir el desarrollo de las lesiones tumorales a través de un efecto selectivo y citostático, el cual fue corroborado por estudios de imagen e histopatológicos, sin encontrarse efectos toxicológicos adversos durante su administración.

Dicho efecto se relaciona con la abundancia de los compuestos β -PGG, ácido gálico, quercetina, fisetina, amentoflavona y miricetina, así como de algunas variantes glicosiladas que fueron identificadas durante la caracterización fitoquímica.

Estudios complementarios, corroboraron que el ácido gálico y la miricetina son los responsables de la actividad antineoplásica de RHTR en el cáncer ovárico, al inhibir el desarrollo de las lesiones tumorales presentes en los roedores, a una dosis de 50 mg/kg vía peritumoral por la inducción de apoptosis y con mínimos efectos toxicológicos. Por lo cual, también podrían ser utilizados en la quimioterapia de esta patología. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se encuentren presentes otros compuestos en RHTR, que pudieran presentar actividad en otros tipos de cáncer.

El ensayo toxicológico, sugiere que RHTR no presenta efectos adversos durante su administración intraperitoneal en ratones; sin embargo, la decocción puede llegar a tener efectos supresores en los procesos hematopoyéticos a altas concentraciones durante períodos prolongados de uso, para lo cual se sugiere utilizarla con precaución.

RHTR podría ser utilizada como tratamiento alternativo o complementario en el cáncer de ovario y adicionalmente, las altas concentraciones de polifenoles, podrían tener un efecto benéfico en la salud, al actuar como quimiopreventivo contra diferentes enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo, sin embargo se requieren de estudios complementarios para confirmar ambas afirmaciones.

12. PERSPECTIVAS.

- Complementar estudio toxicológico con monitoreo del consumo de alimento y agua, así como un análisis general de orina.
- Realizar el estudio experimental con diferentes líneas tumorales que permitan seleccionar un modelo sensible al efecto antitumoral de RHTR.
- Al correlacionar el estudio histopatológico se determinó que las lesiones tumorales corresponden a un tumor de alto grado, el cual modifica la respuesta al tratamiento y su pronóstico, por lo que se recomienda estudiar el efecto antitumoral de RHTR en diferentes grados de anaplasia.
- Utilizar marcadores tumorales que permitan valorar el seguimiento de las lesiones tumorales, como CA-125 y antígeno carcinoembrionario (ACE).
- Evaluar la efectividad del tratamiento con EA-RHTR y paclitaxel en ratones xenotrasplantados con SKOV-3 por 28 días y demostrar un efecto sinérgico entre ambos, con una menor toxicidad durante su administración.
- Realizar el aislamiento de células cancerígenas del líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario y corroborar la actividad antineoplásica del ácido gálico y miricetina observada en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar la interacción del ácido gálico y la miricetina con las proteínas encontradas en el análisis *in silico* mediante DART o resonancia de plasmones.
- Estudiar a profundidad el mecanismo de acción de los principios activos en RHTR con base en los resultados obtenidos en el análisis *in silico*, lo reportado por la bibliografía y por metodologías como la transcriptómica o la proteómica.

13. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbott, B.J., Leiter, J., Hartwell, J.L., Caldwell, M.E., Beal, J.L., Perdue, R.E. & Schepartz, S.A. (1966). Screening data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories. XXXIV. Plant extracts. *Cancer Research*, **26(9 pt 2)**: 1131-1271.
- Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I. & Bello, S.O. (2006). Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musangacecropioides* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **105**: 374–379. DOI: 10.1016/j.jep.2005.11.027.
- Ahmed, M.S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., Elsohly, M.A., Ibrahim, A.S., Mossa, J.S. & El-Ferally, F.S. (2001). A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry*, **58(4)**: 599–602. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00244-8
- Alonso, C. (2009). Mechanisms of chemoresistance in first-line therapy of epithelial ovarian cancer. *Medwave*, **9(10)**: e4217. DOI: 10.5867/medwave.2009.10.4217.
- Ampasavate, C., Okonogi, S. & Anuchapreeda, S. (2010). Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **4(1)**: 013-021
- Andrés-Hernández, A.R., Morrone, J., Terrazas, T. & López-Mata, L. (2006). Análisis de trazos de las especies mexicanas de *Rhus* subgénero *lobadium* (*Angiospermae: Anacardiaceae*). *Interciencia*, **31(12)**: 900-904.
- Araújo, J.R., Goncalves, P. & Martel F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.*, **31(2)**: 77-87. DOI: 10.1016/j.nutres.2011.01.006.
- Badhani, B., Sharma, N. & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.*, **5**: 27540–27557. DOI: 10.1039/c5ra01911g.
- Ballif, B.A. & Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.*, **12**: 397-408.

-
- Bar-Sela, G., Epelbaum, R. & Schaffer, M. (2010). Curcumin as an Anti-Cancer Agent: Review of the Gap Between Basic and Clinical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, **17(3)**: 190-197. DOI: 10.2174/092986710790149738.
- Barrales-Cureño, H.J. & Soto-Hernández, M. (2011). Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *REB.*, **30(1)**: 12-20.
- Bhat, T.A., Nambiar, D., Pal, A., Agarwal, R. & Singh, R.P. (2012). Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis *in vitro* and *in vivo* —implications for angioprevention. *Carcinogenesis*, **33(2)**: 385-393. DOI: 10.1093/carcin/bgr282.
- Botello, D., Capdeville, D., Brom, R., Stankov, A. & Recinos, E. (2006). Diagnostic approachments and basic concept on surgical procedures in ovarian epithelial cancer. *GAMO.*, **5(3)**: 8-10.
- Bozan, B., Kosar, M., Tunalier, Z., Ozturk, N. & Baser, KH.C. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Rhus coriaria* and *Cinnamomum cassia* extracts. *Acta Alimentaria*, **32(1)**: 53–61. DOI: 10.1556/AAlim.32.2003.1.7.
- Bucay-Morocho, L.C. (2009). Estudio Farmacognóstico y Actividad Antimicrobiana de la Violetilla (*Hybanthus parviflorus*). Tesis Doctoral. Facultad en Ciencias de la Escuela superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador, pp: 71.
- Cansu, T.B., Yayli, B., Özdemir, T., Batan, N., Alpay-Karaoglu, S. & Yayli, N. (2013). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr.) growing in Turkey. *Turk. J. Chem.*, **37**: 213-219. DOI: 10.3906/kim-1204-1272.
- Carbone, C. & Maschi, F. (2006). El ratón *nude* (*Nu/Nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*, **5(1)**: 1-13.
- Casebeer, M.R. (2004). Discover California Shrubs. *Hooker Press*, EE.UU.
- Centelles, J.J. & Imperial S. (2010). Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *OFFARM.*, **29(4)**: 68-75.
- Chakraborty, S., Ghosh, U., Bhattacharyya, N.P., Bhattacharyya, R.K. & Roy, M. (2006). Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in k-562 cells. *Mutat. Res.*, **596(1-2)**: 81-90. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.12.007
-

-
- CONABIO. (2009). Biodiversidad Mexicana, Herbario virtual. <Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/otros/cgibin/herbario_imagenes.cgi?familia=Anacardiaceae&genero=Rhus&especie=trilobata&infraesp=&tipo=> (Consultado: 19 junio 2017).
- Costa-Rodrigues-Alves, A.B., Souza-Dos Santos, R., De Santana-Calil, S., Niero, R., Da Silva-Lopes, J., Perazzo, F.F., Pires-Rosa, P.C., Faloni-Andrade, S., Cechinel-Filho, V. & Maistro, E.L. (2014). Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract *in vivo* and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.*, **153(3)**: 694-700. DOI: 10.1016/j.jep.2014.03.033.
- Devi, K.P., Rajavel, T., Habtemariam, S., Nabavi, S.F. & Nabavi, S.M. (2015). Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sciences*, **142(2015)**: 19-25. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.004.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D. (2003). Protocol for the single cell gel electrophoresis / comet assay for rapid genotoxicity assessment. Industrial Toxicology Research Centre (ITRC). <Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/37f8/a506148c9e723989a6098c455966467b9ff6.pdf> > (Consultado: 10 noviembre 2016).
- Du, Y., Yang, J., Kong, Z. & Xiao, L. (1999). Structure and bioactivities of lacquer polysaccharides from Chinese lac trees of wild species and cultispecies. *Chem. J. Chin. Univ.*, **20**: 399–402.
- Dutra, R.C., Pittella F., Dittz D., Marcon R., Pimenta, D.S., Lopes, M.T. & Raposo, N.R. (2012). Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **22(5)**: 971-978. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000042.
- Ecosistemas y Medio Ambiente Sierra Madre S.C. (2009). Estudio Regional Forestal. Unidad de Manejo Forestal Centro Norte A.C. CLAVE 08-11. <Disponible: http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/9/1149ERF_UMAFOR0811.pdf> (Consultado: 10 noviembre 2016).
- El-Sissi, H., Ishak, M.S., El-Wahid, M.S. & El-Ansari, M.A. (1971). The gallotannins of *Rhus coriaria* and *Mangifera indica*. *Planta Med.*, **19(4)**: 342-51. DOI: 10.1055/s-0028-1099652.
-

-
- Espinosa-Monroy, L & Sierra-Vargas, M.P. (2010). Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Neumol. Cir. Torax*, **69(4)**: 200-209.
- Estrada-Castillón, E. & Villarreal-Quintanilla, J.A. (2010). Flora del centro del Estado de Chihuahua, México. *Acta Botánica Mexicana*, **92**: 51-118.
- Fourie, T.G. & Snyckers, F.O. (1984). A flavone with antiinflammatory activity from the roots of *Rhus undulate*. *J. Nat. Prod.*, **47(6)**: 1057–1058.
- Fretes, F. (2010). Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial. *USAID, Paraguay vende*. Paraguay, pp: 60.
- Gallardo-Rincón, D., Montalvo-Esquivel, G., González-Enciso, A., Cantú-De León, D.F., Isla-Ortiz, D., Muñoz-González, D.E., Robles-Flores, J.U., Solorza-Luna, G., Flores-Alatraste, D., Ortega-Rojo, A., Mota-García, A., Morales-Vázquez, F., Cetina-Pérez, M.L., Coronel-Martínez, J.A. & Herrera-Gómez, A. (2011). Oncología: Cáncer epitelial de Ovario. *Cancerología*, **6(2011)**: 53-60.
- Gallardo-Rincón, D. (2006). Ovarian cancer; a biological model. *GAMO.*, **5(3)**: 4-5.
- Gallardo-Rincón, D., León-Rodríguez, E., Cortés-Esteban, P., Alexander-Mesa, F., Padilla-Rosciano, A., Robles-Flores, J.U., De la Garza-Salazar, J.G., Baz-Gutiérrez, P., Erazo-Valle, A., Brom-Valladares, R., Martínez-Said, H., Morales-Vázquez, F. & Poveda, A. (2006). Ovarian epithelial cancer. Chemotherapy for recurrent disease. *GAMO.*, **5(3)**: 20-21.
- García-Ramírez, H.A. (2015). Actividad antiparasitaria de los extractos de la planta regional *Rhus trilobata* en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Tesis Bachiller. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México, pp: 50.
- Giancarlo, S., Rosa, M.L., Nadjafi, F. & Francesco, M. (2006). Hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Nat. Prod. Res.*, **20(9)**: 882–886. DOI: 10.1080/14786410500520186
- Gong, L., Li, Y., Nedeljkovic-Kurepa, A. & Sarkar, F.H. (2003). Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene*, **22**: 4702-4709. DOI: 10.1038/sj.onc.1206583.
-

-
- González-Villa, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Tesis Magistral. Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia. Colombia, pp: 85.
- Granado-Serrano, A. B. (2010). Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. España, pp: 215.
- Gross, G.G. (1992). Enzymes in the Biosynthesis of Hydrolyzable Tannins. En: Hemingway, R.W., Laks, P.E. y Branham, S.J. *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance, Springer*. EE.UU., pp: 43-60.
- Guevara-Rozo, Y.T. (2012). Inhibición de complejos CDK/ciclina en modelos celulares de patología. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia. España, pp: 210.
- Haque, N., Salma, U., Nurunnabi, T.R., Haque, A.K., Mukti, I.J., Pervin, S. & Nahar, R. (2010). Lifestyle related causes of cancer and chemopreventions through phytonutrients. *Pak J. Biol. Sci.*, **13(19)**: 916-926.
- Halle, W. (2003). The registry of cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce testing in animals. *Altern. Lab. Anim.*, **31(2)**: 89-198.
- Herrera-Martínez, M., Hernández-Ramírez, V.I., Hernández-Carlos, B., Chávez-Munguía, B., Calderón-Oropeza, M.A. & Talamás-Rohana, P. (2016). Antiamoebic activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) strother and its effect on the actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*. *Front. Pharmacol.*, **7(169)**: 1-13. DOI: 10.3389/fphar.2016.00169.
- Hossfeld, D.K., Sherman, C.D., Love, R.R. & Bosch, F.X. (1992). Manual de Oncología Clínica. *UICC: International Union Against Cancer, Doyma*. España, pp: 413.
- Hu, H., Lee, H.J., Jiang, C., Zhang, J., Wang, L., Zhao, Y., Xiang, Q., Lee, E.O., Kim, S.H. & Lü, J. (2008). Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl- β -D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells *in vitro* and suppresses prostate xenograft tumor growth *in vivo*. *Molecular Cancer Therapies*, **7(9)**: 2681-2691. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0456.
-

-
- Humason, A.W. (2005). A search for multi-drug resistance pump inhibitor molecules by isolation of natural products. Tesis de Maestria, Faculty of Dedman College, Southern Methodist University. Massachusetts, EE.UU. pp: 75.
- Jigna, P. & Sumitra, C. (2007). Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *African Journal of Biomedical Research*, **(10)**: 175-181.
- Jungmin, O., Heonjoo, J., Ah Reum, C., Sung-Jin, K. & Jaejoon, H. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, **31(2)**: 403-409. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.021.
- Kamatham, S., Kumar, N. & Gudipalli, P. (2015). Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicol. Rep.*, **14(2)**: 520-529. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.03.001.
- Keiser, M., Roth, B.L., Armbruster, B.N., Ernsberger, P., Irwin, J.J. & Shoichet, B.K. (2007). Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nature Biotechnology*, **25(2)**: 197-206. DOI: 10.1038/nbt1284.
- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Jaye, L.V. & Sigman, C.C. (2000). Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *American Society for Nutritional Sciences*, **130(2)**: 467- 471.
- Khurana, S., Hollingsworth, A., Piche, M., Venkataraman, K., Kumar, A., Ross, G.M. & Tai, T.C. (2014). Antiapoptotic Actions of Methyl Gallate on Neonatal Rat Cardiac Myocytes Exposed to H₂O₂. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014(657512)**: 1-9. DOI:10.1155/2014/657512.
- Kim, H., Lee, G., Sohn, S-H., Lee, C., Kwak, J.W. & Bae, H. (2016). Immunotherapy with methyl gallate, an inhibitor of Treg cell migration, enhances the anti-cancer effect of cisplatin therapy. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **20(3)**: 261-268. DOI:10.4196/kjpp.2016.20.3.261.
- Kuo, S.C., Teng, C.M., Lee, L.G., Chiu, T.H., Wu, T.S., Huang, S.C., Wu, J.B., Shieh, T.Y., Chang, R.J. & Chou, T.C. (1991). 6-Pentadecylsalicylic acid: An antithrombin
-

-
- component isolated from the stem of *Rhus semialata* var. *roxburghii*. *Planta Med.*, **57(3)**: 247–249. DOI: 10.1055/s-2006-960083.
- Lai, H.Y., Lim, Y.Y. & Kim, K.H. (2010). *Blechnum Orientale* Linn – a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **10(15)**: 1-8. DOI: 10.1186/1472-6882-10-15.
- Lee, H., Lee, H., Kwon, Y., Lee, J-H., Kim, J., Shin, M-K., Kim, S-H. & Bae, H. (2010). Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, **185**: 6698-6705. DOI: 10.4049/jimmunol.1001373.
- Lee, J.C., Lee, K.Y., Kim, J., Na, C.S., Jung, N.C., Chung, G.H. & Jang, Y.S. (2004). Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem. Toxicol.*, **42(9)**: 1383–1388. DOI: 10.1016/j.fct.2004.03.012
- Lee, S.H., Nan, J.X., Zhao, Y.Z., Woo, S.W., Park, E.J., Kang, T.H., Seo, G.S., Kim, Y.C. & Sohn, D.H. (2003). The chalcone butein from *Rhus verniciflua* shows antifibrogenic activity. *Planta Med.*, **69(11)**: 990–994. DOI: 10.1055/s-2003-45143
- Lee, J.C., Lim, K.T. & Jang, Y.S. (2002). Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochem. Biophys. Acta*, **1570(3)**: 181–191. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00196-4.
- Lentini, F. (2000). The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia* **71(Suppl. 1)**: 583-588. DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00179-9.
- Lin, Y.M., Flavin, M.T., Schure, R., Chen, F.C., Sidwell, R., Barnard, D.L., Huffman, J.H. & Kern, E.R. (1999). Antiviral activities of bioflavonoids. *Planta Med.*, **65(2)**: 120–125.
- Lizano, M. & Barrera, R. (1993). Resistencia múltiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. *Rev. Invest. Clin.*, **(45)**: 481-492.
- López-Graniel, C.M., Aranda-Flores, C., Gharzouzi-Bassila, E., Barajas-Figueroa, J., Martínez-Saíd, H. & Cortés S. (2006). Advanced ovarian cancer. Surgical management and resectability predictor index. *GAMO.*, **5(3)**: 14-16.
-

-
- Maiyo, C.F., Moodley, R. & Singh, M. (2016). Cytotoxicity, Antioxidant and Apoptosis Studies of Quercetin-3-O Glucoside and 4-(β -D-Glucopyranosyl-1 \rightarrow 4- α -L-Rhamnopyranosyloxy)-Benzyl Isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **16(5)**: 648-656. DOI: 10.2174/1871520615666151002110424.
- Márquez, A., Nez, T., Tortalita, I. & Washburn, S. (2001). *Rhus trilobata* nutt. Medicinal plants of Southwest. <Disponible en: <http://medplant.nmsu.edu/rhus.shtml>> (Consultado: 10 noviembre 2016).
- Martínez-Tlahuel, J.L., Gallardo-Rincón, D., Martínez-Said, H. & Ochoa-Carrillo, F.J. (2006). Ovarian epithelial cancer: Intraperitoneal chemotherapy. *GAMO.*, **5(3)**: 22-24.
- McCune, L.M. & Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.*, **82(2-3)**: 197–205. DOI: 10.1016/S0378-8741(02)00180-0.
- McCutcheon, A.R., Ellis, S.M., Hancock, R.E. & Towers, G.H. (1994). Antifungal screening of medicinal plants of British Columbia native peoples. *J. Ethnopharmacol.*, **44(3)**: 157–169.
- Medina-Lemos, R. & Fonseca, R.M. (2009). *Anacardiaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, **71**: 1-54.
- Micetick, K.C., Barnes, D. & Erickson, L.C. (1985). A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(dimamino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum (II) and cis-diamminedichloroplatinum (II) on L1210 cells. *Cancer Res.*, **45(9)**: 4043-4047.
- Mizushima, Y., Ishidoh, T., Takeuchi, T., Shimazaki, N., Koiwai, O., Kuramochi, K., Kobayashi, S., Sugawara, F., Sakaguchi, K. & Yoshida, H. (2005). Monoacetylcurcumin: A new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase λ and a new ligand for inhibitor-affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337(4)**: 1288–1295. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.005.
- Mohan, S., Thiagarajan, K., Chandrasekaran, R. & Arul, J. (2014). *In vitro* protection of biological macromolecules against oxidative stress and *in vivo* toxicity evaluation of
-

-
- Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, **14(2014)**: 257-270. DOI: 10.1186/1472-6882-14-257.
- Mohd Nazrul Hisham, D., Mohd Lip, J., Mohd Noh, J., Normah, A. & Nurul Nabilah, M.F. (2011). Identification and isolation of methyl gallate as a polar chemical marker for *Labisia pumila* Benth. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, **39(2)**: 279–284.
- Montalvo-Arenas, C.E. (2010). Técnica histológica. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. <Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf> (Consultado: 10 noviembre 2016).
- Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, **29**: 73-82.
- Moo-Puc, R., Robledo, D. & Freile-Pelegrián, Y. (2009). *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, México. *Ciencias Marinas*, **35(4)**: 345-358.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65(1–2)**: 55–63.
- Murayyan, A.I., Manohar, C.M., Hayward, G. & Neethirajan, S. (2017). Antiproliferative activity of Ontario grown onions against colorectal adenocarcinoma cells. *Food Research International*, **96**: 12-18. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.03.017.
- Murphy, C.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12(4)**: 564-582.
- Nasar-Abbas, S.M. & Halkman, A.K. (2004). Inhibition of some foodborne bacteria by alcohol extract of sumac (*Rhus coriaria* L.). *J. Food Safety*, **24(4)**: 257–267. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2004.00506.x.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Guidelines V. 1.2016: *Ovarian Cancer*. <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf> (Consultado: 17 abril 2017).
- Natural Resources Conservation Service. Plants Database: *Rhus trilobata* Nutt. U.S. Department of Agriculture. <Disponible en <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=RHTR>> (Consultado: 10 noviembre 2016).
-

-
- Nguyen, T.T. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*, **25(5)**: 647-659. DOI: 10.1093/carcin/bgh052.
- Nieves-Cabos, S. (2001). Capítulo 2, biología general del reactivo biológico. En: *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal, Interamericana*. España, pp: 682.
- Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N. & Hirose, M. (2001). Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, **39(11)**: 1063-70. DOI: 10.1016/S0278-6915(01)00054-0.
- Novoa-Vargas, A. (2014). Historia natural del cáncer de ovario. *Ginecol. Obstet. Mex.*, **82(9)**: 613-622.
- OMS. (2005). Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional. *Health for all*. Ginebra, pp: 65.
- OMS. (1998). Quality Control Methods for Plant Materials. <Disponible en: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>> (Consultado: 19 junio 2017).
- Oshima, R. & Kumanotani, J. (1984). Structural studies of plant gum from sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*. *Carb. Res.*, **127(1)**: 43–57.
- Palacio, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas, una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín económico de ICE*, **14(2652)**: 29-40.
- Park, K.Y., Jung, G.O., Lee, K.T., Choi, J., Choi, M.Y., Kim, G.T., Jung, H.J. & Park, H.J. (2004). Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J. Ethnopharmacol.*, **90(1)**: 73–79. DOI: 10.1016/j.jep.2003.09.043.
- Pérez-López, L.A. (2005). Aislamiento y Caracterización de Compuestos de Plantas del noroeste de México con actividad contra Cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. pp: 150.
- Pettit, G.R., Saldana, E.I. & Lehto, E. (1974). Antineoplastic agents 35. *Rhus trilobata*. *Lloydia* **37(3)**: 539-540.
- Piñeyro-López, A. (2009). Herbolaria. El Reino Vegetal, Farmacología y Terapéutica. *Conocimiento*, **1(89)**: 4-5.
-

-
- Pszczola, D.E. (2003). Getting more fruits and vegetables into foods. *Food Tech.*, **57**: 52-63.
- Pons-Porrata, L.M., García-Gómez, O., Salmon-Cruzata, A., Macías-Navarro, M.M. & Guerrero-Fernández C.M. (2012). Ovarian tumors: patogenia, clinical pattern, echographic and histopathological diagnosis. *MEDISAN*, **16(6)**: 920.
- Poveda, A. (2006). Ovarian cancer: are the news good enough. *GAMO*, **5(3)**: 25-32.
- Quiñones, E., Loghin, A., López-Marín, L., Stolnicu, S & Nogales, F.F. (2013). Carcinoma renal asociado con translocación Xp11. Análisis de dos casos del adulto, uno de ellos con presentación primaria como metástasis ovárica. *Revista Latinoamericana de Patología*, **51(4)**: 239-243.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52(5)**: 507-526. DOI: 10.1002/mnfr.200700326.
- Rayne S. & Mazza G. (2007). Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus* spp.): a review. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **62(4)**: 165-175. DOI: 10.1007/s11130-007-0058-4.
- Rivas-Corchado, L.M., González-Geroniz, M. & Hernández-Herrera, R.J. (2011). Perfil epidemiológico del cáncer de ovario. *Ginecol. Obstet. Mex.*, **79(9)**: 558-564.
- Rodríguez-Palomares, I.A. (2014). Antioxidant activity of *Rhus trilobata* plant extracts. Biotechnology Summit 2014. International Foundation for Biotechnology Research & Early Stimulation in the Culture of Health, Nutrition, Sport, Art, Science, Technology & Society, A.C. Oaxaca. Mexico, pp: 414.
- Romero-Cerecero, O. & Tortoriello-García, J. (2007). Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. *Rev Med Inst. Mex. Seguro Soc.*, **45(5)**: 453-458.
- Rose, N. (2005). *Rhus trilobata*: Worthy plant seeks worthy name. *Arnoldia*, **63(4)**: 23-25.
- Rzedowski, J. & Calderón-Rzedowski, G. (1999). *Anacardiaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*, **78**: 19-34.
- Saenzpardo-Reyes, E. (2014). Efecto de extractos de *Rhus trilobata* en células de cáncer de ovario humano. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México, pp: 80.
-

-
- Sagdic, O. & Ozcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, **14(3)**: 141–143. DOI:10.1016/S0956-7135(02)00057-9
- Sang-Bong, L. & Hae-Ryong, P. (2010). Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4(10)**: 891-896. DOI: 10.5897/JMPR10.043.
- Sánchez-Ramírez, B. (1985). Determinación de la actividad citotóxica del extracto crudo y las fracciones de la planta regional *Rhus trilobata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México. pp: 70.
- Sarkar, F.H. & Li, Y. (2007). Targeting multiple signal pathways by chemopreventive agents for cancer prevention and therapy. *Acta Pharmacol. Sin.*, **28(9)**: 1305-15.
- Saxena, G., McCutcheon, A.R. & Farmer, S. (1994). Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *J. Ethnopharmacol.*, **42(2)**: 95-99. DOI: 10.1016/0378-8741(94)90102-3
- Schlaepfer, L. & Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **41(4)**: 18-27.
- Scianna, J. (2004). *Rhus trilobata*. *American Nurseryman*, **200(7)**: 74.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf> (Consultado: 19 junio 2017).
- Shaw, N.L. & DeBolt, A.M. (2004). *Rhus trilobata* Nutt. *Anacardiaceae*. En: John, K.F. Eds. *Wildland Shrubs of the United States and its Territories: Thamnic Descriptions*, pp. 634-636, U.S. Department of Agriculture, EE.UU.
- Shin, H., Park, Y., Choi, J.H., Jeon, Y.H., Byun, Y., Sung, S.H. & Lee, K.Y. (2017). Structure elucidation of a new triterpene from *Rhus trichocarpa* roots. *Magn. Reson. Chem.*, **1**: 1-4. DOI: 10.1002/mrc.4574.
- Shin, S.H., Koo, K.H., Bae, J.S., Cha, S.B., Kang, I.S., Kang, M.S., Kim, H.S., Heo, H.S., Park, M.S., Gil, G.H., Lee, J.Y., Kim, K.H., Li, Y., Lee, H.K., Song, S.W., Choi, H.S., Kang, B.H. and Kim, J.C. (2013). Single and 90-day repeated oral dose toxicity studies
-

-
- of fermented *Rhus verniciflua* stem bark extract in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, **55**: 617-626. DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.043.
- Spencer, J.P., Rice-Evans, C. & Williams, R.J. (2003). Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J. Biol. Chem.*, **278(37)**: 34783-34793. DOI: 10.1074/jbc.M305063200.
- Sterling, T. & Irwin, J.J. (2015). ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.*, **55(11)**: 2324–2337. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00559
- Suffness, M. & Pezzuto, J.M. (1990). Assays related to cancer drug discovery. En: Hostettmann, K. *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*, Academic Press. London, pp: 71-133.
- Taborda-Martínez, M.E. (2009). Estudio fitoquímico preliminar y actividad antimalárica del extracto etanólico total de *Coccocypselum hirsutum* (*Rubiaceae*), DUAZARY. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Magdalena*, **6(2)**: 118-123.
- UNIBIO. (2008). Galería Virtual *IreKani*. <Disponible en: http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/14565?mode=full&submit_simple=Muestra+el+registro+Dublin+Core+completo+del+%C3%ADtem&proyecto=Irekani> (Consultado: 19 junio 2017).
- Varela-Rodríguez, L., Salas-Muñoz, E., García-Triana, A., González-Horta, M.C. & Sánchez-Ramírez, B.E. (2013). Actividad citotóxica del extracto acuoso y en metanol de la planta regional *Rhus trilobata* en la línea celular de cáncer de colon CACO-2. Tesis Magistral, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. México, pp: 185.
- Viveros-Valdez, E., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Castro-Garza, J. & Carranza-Rosales, P. (2010). Antiproliferative effect from the Mexican Poleo (*Hedeoma drummondii*). *Journal of Medicinal Food*, **13(3)**: 740-742. DOI: 10.1089/jmf.2009.0041.
- Warnock-Turner, M. (2009). Remarkable Plants of Texas: Uncommon Accounts of Our Common Natives. *University of Texas Press*. EE.UU., pp: 336.
- Wright, A.A., Cronin, A., Milne, D.E., Bookman, M.A., Burger, R.A., Cohn D.E., Cristea, M.C., Griggs, J.J., Keating, N.L., Levenback, C.F., Mantia-Smaldone, G., Matulonis,
-

-
- U.A., Meyer, L.A., Niland, J.C., Weeks, J.C. & O'Malley D.M. (2015). Use and Effectiveness of Intraperitoneal Chemotherapy for Treatment of Ovarian Cancer. *Clin. Oncol.*, **33(26)**: 2841-2847. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.4776.
- Wu, P.L., Lin, S.B., Huang, C.P. & Chiou, R.Y-Y. (2002). Antioxidative and cytotoxic compounds extracted from the sap of *Rhus succedanae*. *J. Nat. Prod.* **65(11)**: 1719–1721. DOI: 10.1021/np0201467.
- Yang, G.Y., Liao, J., Li, C., Chung, J., Yurkow, E.J., Ho, C.T. & Yang, C.S. (2000). Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* **21(11)**: 2035-2039.
- Yang, H., Gu, Q., Gao, T., Wang, X., Chue, P., Wu, Q. & Jia, X. (2014). Flavonols and derivatives of gallic acid from young leaves of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roemer and evaluation of their anti-oxidant capacity by chemical methods. *Pharmacogn. Mag.*, **10(38)**: 185-90. DOI: 10.4103/0973-1296.131034.
- Yang, J. & Du, Y. (2003). Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. *Carb. Polym.*, **52(4)**: 405–410. DOI: 10.1016/S0144-8617(02)00330-2.
- Yasue, M. & Kato, Y. (1957). Components of wood of *Rhus trichocarpa*. *Chem. Abstr.*, **52**: 1605.
- Yu, R., Jiao, J-J., Duh, J-L., Gudehithlu, K., Tan, T-H. & Kong, A.T. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis*, **18(2)**: 451–456.
- Zalacaín-Aramburu, A. (2001). Estudio de extractos tánicos obtenidos a partir de hoja de zumaque (*Rhus coriaria* L.). Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos en la Universidad de Castilla-La Mancha. España, pp: 161.
- Zou, C., Brewer, M., Cao, X., Zang, R., Lin, J., Deng, Y. & Li, C. (2007). Antitumor activity of 4-(N-hydroxyphenyl)retinamide conjugated with poly(L-glutamic acid) against ovarian cancer xenografts. *Gynecol. Oncol.*, **107(3)**: 441-449. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.07.077.
-

14. APÉNDICES.

Apéndice 1. Compuestos fitoquímicos detectados en RHTR mediante UPLC-MS^E.

Comp.	Neutral mass (Da)	ESI + (m/z)	ESI - (m/z)	RT (min)	Max. Abun.	Sample	AF02	ID	Compound name	Adducts	Formula	Mass Error (ppm)	Score (%)	Biological activity	Presence in plants
1	264.0423	282.0745		1.10	1.82	AE		CHEBI:5179	Frutinine A	M+NH ₄	C16H8O ₄	-5.97	94.59	Antibacterial, antifungal	<i>Polygala fruticosa</i>
2	246.1643	291.1387		1.54	4.05	AE		CSID4445151	Geroquinol	M+H-H ₂ O, M+2Na-H	C16H ₂₂ O ₂	9.47	90.94	Antioxidant, cytotoxic, allergen	<i>Cordia allaeagnoides</i>
3	120.0423		119.0349	1.72	1.56	AE		CHEBI:86371	3,4-dihydroxybutyric acid	M-H	C ₄ H ₈ O ₄	-0.76	94.81	Metabolism	
4	180.0632		179.0556	1.72	12.38	AE		CSID26584598	D-Glucopyranose	M-H ₂ O-H, M-H	C ₆ H ₁₂ O ₆	-1	97.06	Metabolism	
5	342.1136		341.1064	1.72	136.34	AE		CHEBI:17505	α-D-galactosyl-(1-3)-1D-myo-inositol	M-H, 2M-H, 3M-H	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-7.37	98.98	Metabolism	
6	504.1690		503.1610	1.72	26.76	AE		CHEBI:31005	Mannitriose	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	-1.41	98.61	Metabolism	
7	484.1634		529.1594	1.72	7.24	AE		CHEBI:90312	γ-aminooorcin	M+FA-H	C ₂₈ H ₂₄ N ₂ O ₆	-4.69	92.80		
8	282.0951		845.2779	1.72	11.10	AE		CHEBI:28309	Xylobiose	3M-H	C ₁₀ H ₁₈ O ₉	-0.13	91.52	Estructure	
9	90.0317		89.0241	1.72	2.78	AE		CSID731	Glyceraldehyde	M-H	C ₃ H ₆ O ₃	-3	96.07	Metabolism	
10	192.0634		173.0456	1.80	2.78	AE		CHEBI:17521	Quinic acid I	M-H ₂ O-H	C ₇ H ₁₂ O ₆	0.08	91.28	Metabolism	
11	226.0477		271.0463	1.80	3.06	AE		CHEBI:64497	Cspyrone B1	M+FA-H	C ₁₀ H ₁₀ O ₆	1.37	96.14	Metabolism	
12	314.0638	315.0823		1.80	2.15	ME		CHEBI:30997	Levogluconan gallate	M+H	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	3.35	97.06	Antioxidant	<i>Rhus coriaria</i> L.
13	332.0729		331.0657	1.80	31.22	AE		CHEBI:15834	1-O-gallolyl-β-D-glucose	M-H, M+FA-H	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	-4.1	97.22	Estructure	
14	414.1373		435.1148	1.80	1.78	AE		CHEBI:62781	α-L-Araf-(1-5)-α-L-Araf-(1-5)-L-Araf Phellatin	M+Na-2H	C ₁₅ H ₂₆ O ₁₃	6.67	92.21	Estructure	
15	534.1787		515.1609	1.80	32.44	AE		LMPK12111709	Phellatin	M-H ₂ O-H, M-H	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	9.32	94.48	Antioxidant	<i>Punica granatum</i> L.
16	638.2211		673.1853	1.80	0.95	ME		LMPK12140461	4'-Hydroxy-5,7,2'-trimethoxyflavanone 4'-rhamnosyl-(1→6)-glucoside	M+Cl	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	-8.05	95.68	antioxidant	<i>Terminalia alata</i>
17	104.0473		85.0295	1.80	0.72	AE		LMFA01050006	4-hydroxy-butyric acid	M-H ₂ O-H	C ₄ H ₈ O ₃	-0.47	95.03	Metabolism	
18	876.3052		857.2809	1.80	3.89	AE		CHEBI:84416	Cleistanthin E	M-H ₂ O-H	C ₄₂ H ₅₂ O ₂₀	-7.32	97.30	anticancer	<i>Cleistanthus collinus</i>
19	126.0317		125.0243	1.85	0.69	AE		CHEBI:16458	Triacetate lactone	M-H	C ₆ H ₆ O ₃	-0.71	93.04		
20	138.0317		137.0243	1.85	0.63	AE		CHEBI:16914	Salicylic acid	M-H	C ₇ H ₆ O ₃	-0.82	92.06	Metabolism	<i>Spiraea</i> spp.
21	170.0215		169.0145	1.85	1.82	AE		CHEBI:30778	Gallic acid I	M-H	C ₇ H ₆ O ₅	1.51	92.98	Antioxidant, antibacterial	<i>Rhus</i> spp.
22	344.0743		343.0688	1.85	3.54	ME		CHEBI:9522	Theogallin I	M-H	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	5.12	92.68	Antioxidant	
23	215.9780	216.9858		1.93	3.51	AE		CHEBI:132089	Sodium glycerol 2-phosphate	M+H-H ₂ O, M+H	C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P	2.28	96.42	Metabolism	
24	210.0740		191.0552	2.41	18.95	AE		CHEBI:42976	L-glycero-α-D-mannoheptopyranose	M-H ₂ O-H	C ₇ H ₁₄ O ₇	-4.51	98.19	Antibacterial, metabolism	
25	356.1319		391.1055	2.41	4.11	ME		CSID30777348	Galactopinitol A	M+Cl	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₁	11.88	96.73	Metabolism	<i>Simmondsia chinensis</i>
26	294.0376		275.0224	2.47	2.10	ME		CHEBI:9697	Tricozanin A	M-H ₂ O-H	C ₁₃ H ₁₀ O ₈	8.93	92.37	Citotoxic, antineoplastic	<i>Tritonia crocosmaeflora</i>
27	356.0955		337.0777	2.72	4.02	AE		CHEBI:71210	β-D-GlcpA-(1→3)-β-D-Galp	M-H ₂ O-H	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₂	0.14	96.01	Antiinflammatory, antifungal	<i>Acanthophyllum gypsophiloides</i>
28	622.1956		643.1732	2.95	9.57	ME		CHEBI:78617	4-hydroxybenzoic acid 4-(6-O-sulfo)glucopyranoside	M+Na-2H	C ₂₂ H ₃₈ O ₂₀	4.7	95.61	Metabolism	<i>Ferula gumosa</i>
29	170.0215		169.0142	3.08	0.59	ME		CHEBI:30778	Gallic acid II	M-H	C ₇ H ₆ O ₅	-0.08	91.64	Antioxidant, antibacterial	<i>Rhus</i> spp.
30	286.0689		331.0671	3.08	10.77	ME		CHEBI:88743	Diphenol glucuronide	M+FA-H	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	0.01	98.53	Antioxidant	
31	130.0266		111.0086	3.26	1.02	AE		LMFA01170099	Citraconic acid	M-H ₂ O-H	C ₅ H ₆ O ₄	-1.45	93.83	Metabolism	
32	238.0689		273.0389	3.47	1.20	ME		CHEBI:32817	keto-3-deoxy-D-mannoctulosonic acid	M+Cl	C ₈ H ₁₄ O ₈	2.69	90.86	Estructure	<i>Lycopodium pinifolium</i>
33	192.0628		191.0553	4.32	31.95	AE		CSID16498843	Quinic acid II	M-H ₂ O-H, M-H	C ₇ H ₁₂ O ₆	-2.56	99.50	Metabolism	
34	162.0317		369.0640	4.32	2.75	AE		CHEBI:113542	3-hydroxy-1-benzopyran-2-one	2M+FA-H	C ₉ H ₆ O ₃	7.51	92.04	Antioxidant, antineoplastic, antiinflammatory	<i>Glycosmis pentaphylla</i>
35	476.0955		457.0800	4.32	0.90	AE		LMPK12110646	Luteolin 7-methylglucuronide	M-H ₂ O-H	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	4.94	96.49	Antioxidant,	<i>Rhus typhina</i>
36	104.0473		85.0294	4.32	0.43	AE		CSID10792	Hydroxybutyric acid	M-H ₂ O-H	C ₄ H ₈ O ₃	-1.3	95.03	Metabolism	
37	306.0740		305.0672	4.89	1.19	ME		LMPK12020004	Epigallocatechin	M-H	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	1.82	97.83	Antioxidant	<i>Rhus</i> spp.
38	210.0164	248.9802		5.43	0.80	ME		CHEBI:46032	Trimesic acid	M+K	C ₉ H ₆ O ₆	3.07	95.79	Metabolism, antihemorrhagic, antipsoriatics, antibacterial	<i>Schisandra propinqua</i>
39	444.1995		443.1926	5.51	4.19	ME	*	LMPR0103050006	Dihydrophasic acid 4-O-beta-D-glucoside	M+H	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	0.81	96.24	Antioxidant,	<i>Carthamus tinctorius</i>
40	270.0740		315.0722	5.87	4.09	ME		CHEBI:64681	Phenol O-(β-D-glucuronide)	M+FA-H	C ₁₂ H ₁₄ O ₇	0.03	96.74	Antiinflammatory, antioxidant	<i>Cardiospermum halicacabum</i>
41	372.1420		417.1402	5.95	0.95	AE	*	CHEBI:66073	1-[(3-methylbutanoyl)phloroglucinyl]-β-D-glucopyranoside	M+FA-H	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	-0.04	97.74	Antiinflammatory	<i>Indigofera heterantha</i>
42	212.0473		483.1120	5.95	4.28	ME	*	CSID4528673	Urolithin B	2M+Hac-H	C ₁₃ H ₈ O ₃	8.14	98.52	Antioxidant, antiinflammatory, antineoplastic, antibacterial	
43	184.0372	185.0862		6.05	1.39	ME		CID=7428	Methyl gallate I	M+H	C ₈ H ₈ O ₅	0.002	99.50	Antioxidant	<i>Rhus</i> spp.
44	344.0746		343.0670	6.13	12.61	ME		CHEBI:9522	Theogallin II	M-H ₂ O-H, M-H	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	1	93.43		
45	596.1741		595.1685	6.13	1.54	ME		LMPK12140065	Butrin	M-H	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	2.74	90.14	Antioxidant	<i>Butea monosperma</i> L.
46	197.0450		453.1040	6.18	1.79	ME	*	CHEBI:58279	3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactate	2M+Hac-H	C ₉ H ₉ O ₅	0.47	90.59	Metabolism	<i>Nepeta Pratii</i>
47	480.1268	479.0986		6.18	11.34	ME		CID=471	Methyl-dihydroquercetin hexoside	M+H	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	0.47	96.74	Antioxidant	<i>Rhus coriaria</i> L.
48	494.0697		493.0628	6.18	3.04	ME	*	LMPK12112437	Myricetin 3-glucuronide	M-H	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₄	0.8	97.26	Antioxidant	<i>Rhus</i> spp.
49	450.0798		495.0776	6.18	22.75	ME	*	HMDB41635	Myricetin 3-arabinoside	M+FA-H	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	0.56	98.42	Antioxidant	<i>Rhus</i> spp.
50	484.1217		521.0742	6.18	2.45	ME		LMPK12020205	Diospyrin	M+K-2H	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₃	8.16	97.09	Antineoplastic, antiinflammatory, antibacterial	<i>Diospyros lotus</i>

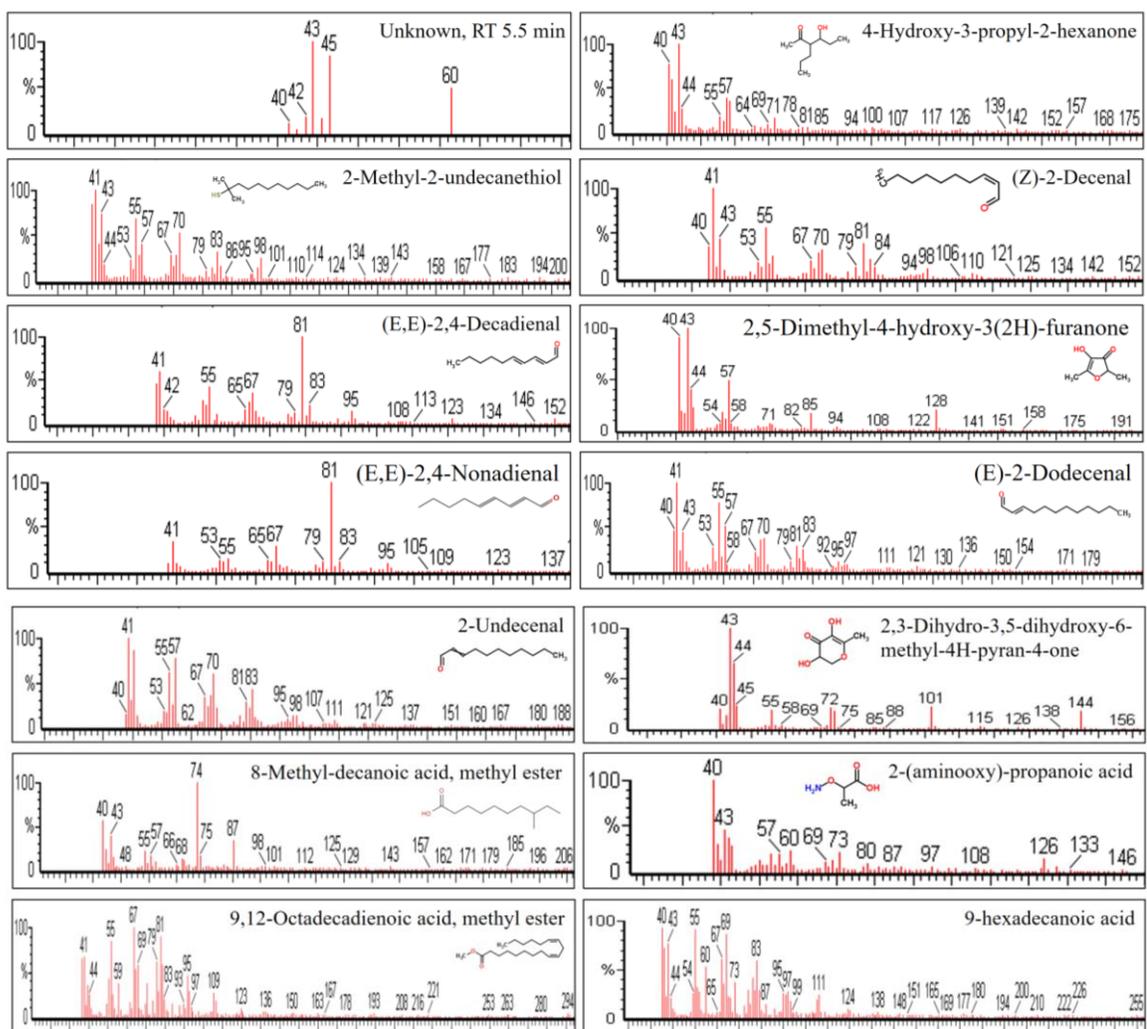
51	134.0215	135.0475	6.26	1.76	ME	CHEBI:6650	Malic acid I	M+H	C4H6O5	0.01	93.83	Metabolism	<i>Rhus coriaria L.</i>
52	138.0317	137.0243	6.26	1.55	AE	135	4-Hydroxybenzoic acid I	M-H	C7H6O3	-1.04	92.06	Cytotoxic, antineoplastic, antihemorrhagic, metabolism	<i>Rhus coriaria L.</i>
53	566.1636	587.1395	6.26	1.06	ME	LMPK12120103	Butein 4'-arabinosyl-(1->4)-galactoside	M+Na-2H	C26H30O14	2.22	92.83	Antioxidant	<i>Rhus spp</i>
54	290.0790	289.0715	6.31	12.30	AE	* LMPK12020001	(+)-Catechin	M-H	C15H14O6	-0.86	96.97	Antioxidant	<i>Rhus spp</i>
55	450.2042	485.1776	6.31	0.51	ME	CHEBI:66763	Plectranthol A	M+Cl	C27H30O6	8.84	93.51	Antioxidant	<i>Plectranthus nummularius</i>
56	123.0081	168.0063	6.44	3.43	ME	CHEBI:58474	Hydroxybenzoquinone	M+FA-H, 2M+Hac-H	C6H3O3	-0.91	94.57	Antiviral	<i>Myrsine coriacea</i>
57	184.0372	183.0280	6.44	35.18	ME	CSID70398	Methyl gallate II	M-H	C8H8O5	-10.02	97.08	Antioxidant	<i>Rhus spp.</i>
58	228.0423	209.0264	6.44	6.33	ME	CHEBI:4946	Euxanthone	M-H2O-H	C13H8O4	8.76	90.85	Vasodilatador	<i>Polygala caudata</i>
59	316.0583	297.0411	6.44	3.03	ME	LMPK12050443	5,6,7,4'-Tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone	M-H2O-H	C16H12O7	2.16	92.37	Antioxidant	
60	420.1632	401.1451	6.44	5.51	AE	* LMPR010207001	Lamioside	M-H2O-H	C18H28O11	-0.41	92.33		
61	484.0853	465.0688	6.80	2.26	ME	* CHEBI:15723	1,6-bis-O-galloyl-β-D-glucose	M-H2O-H	C20H20O14	2.77	97.56	Metabolism	<i>Acacia mearnsii</i>
62	636.0963	635.0908	6.80	5.76	ME	CHEBI:27395	1,2,6-tris-O-galloyl-β-D-glucose	M-H	C27H24O18	2.78	94.56	Metabolism	<i>Rhus spp</i>
63	102.0681	249.1356	6.87	0.51	ME	LMFA01010005	Valeric acid	2M+FA-H	C5H10O2	5.88	94.22	Antibacterial, antifungal, neuroprotective	<i>Valeriana officinalis</i>
64	382.1839	381.1769	6.87	6.52	AE	* CHEBI:59465	β-D-Glcp3,6Me ₂ -(1→4)-α-L-Rhap2,3-Me ₂	M-H	C16H30O10	0.7	96.26		
65	153.0188	152.0113	6.98	0.55	AE	CHEBI:36241	Protocatechuic acid	M-H	C7H5O4	-1.05	91.86	Antioxidant, antineoplastic, antiinflammatory	<i>Rhus spp</i>
66	154.0266	153.0193	6.98	0.53	AE	CHEBI:68465	2,6-dihydroxybenzoic acid	M-H	C7H6O4	-0.12	91.85	Antibacterial, antiinflammatory	
67	286.0689	285.0615	6.98	7.43	AE	* CHEBI:91166	2,3-dihydroxybenzoic acid 3-O-β-D-xyloside	M-H	C12H14O8	-0.38	99.19		
68	436.1158	417.1019	7.05	29.69	AE	* HMDB38831	Epigallocatechin 3-cinnamate	M-H2O-H	C24H20O8	10.66	95.77		<i>Ocotea porosa</i>
69	222.0528	443.1008	7.05	2.65	AE	* CHEBI:81121	Isofraxidin	2M-H	C11H10O5	5.54	92.51	Cytotoxic, antioxido	<i>Acanthopanax senticosus</i>
70	210.0376	243.0722	7.10	1.56	ME	LMFA01170108	Glucaric acid	M+CH3OH+H	C6H10O8	5.59	97.10	Metabolism, antineoplastic	<i>Malus domestica</i>
71	226.0994	271.0691	7.10	0.67	ME	LMPK12020227	7-Hydroxyflavan	M+2Na-H	C15H14O2	-6.52	96.22	Antidepressants, antineoplastic, antioxidant, antifungal	<i>Dracaena cinnabari</i>
72	404.1107	449.1090	7.10	3.22	ME	* LMPK12113059	6,5'-Dihydroxy-3,5,7,2',4'-pentamethoxyflavone	M+FA-H	C20H20O9	0.24	96.17	Antioxidant	<i>Distemonanthus benthamianus</i>
73	283.1281	611.2572	7.23	1.45	ME	CSID8079551	His-Gln	2M+FA-H	C11H17N5O4	5.06	95.03	Metabolism	
74	364.0420	787.1027	7.28	3.58	ME	CHEBI:15652	5-xanthylic acid	2M+Hac-H	C10H13N4O9P	6.62	95.19		
75	594.1100	631.0941	7.36	16.31	ME	CSID3525015	3,5-Digalloylepicatechin	M+Cl, M+K-2H	C29H22O14	15.28	97.44	Antioxidant	
76	622.1170	657.0923	7.36	1.51	ME	LMPK12110359	Apigenin 7-glucuronosyl-(1->2)-glucuronide	M+Cl	C27H26O17	9.55	92.51	Antioxidant	
77	580.1581	561.1413	7.49	12.37	ME	* LMPK12140258	Naringenin 7-(2-p-Coumaroylglucoside)	M-H2O-H	C30H28O12	1.83	91.55	Antioxidant	
78	240.0634	285.0621	7.54	0.53	AE	CHEBI:86946	Syringic acid acetate	M+FA-H	C11H12O6	2.11	97.44	Chemopreventive	<i>Lepisorus contortus</i>
79	186.1256	417.2500	7.54	0.84	AE	* CHEBI:17130	10-oxocaproic acid	2M+FA-H	C10H18O3	1.55	99.04	Antiinflammatory, antibacterial	
80	296.1008	331.0672	7.67	3.95	AE	CSID14526368	Tyr-Asp	M+Cl	C13H16N2O6	-10.23	95.23	Metabolism	
81	480.0904	479.0832	7.67	8.92	ME	LMPK12112438	Myricetin 7-glucoside	M-H	C21H20O13	0.13	97.47	Metabolism	
82	524.1166	569.1156	7.67	1.27	ME	LMPK12113046	5,7,2',3',4'-Pentahydroxy-3,6-dimethoxyflavone 7-glucoside	M+FA-H	C23H24O14	1.5	98.58	Antioxidant	<i>Trianax procumbens</i>
83	260.0202	241.0022	7.72	5.72	AE	CHEBI:16809	D-glucose 6-sulfate	M-H2O-H	C6H12O9S	-0.71	92.73	Metabolism	
84	274.0841	319.0537	7.72	13.58	ME	CHEBI:5066	Fisetinidol	M+2Na-H	C15H14O5	-5.79	99.28	Antioxidant, antiinflammatory	<i>Rhus constitis, Rhus verniciflua</i>
85	212.0837	483.1876	7.80	2.49	AE	* CSID4444110	Pinosylvin	2M+Hac-H	C14H12O2	14.94	95.62	Antifungal, antibacterial	<i>Pinus sylvestris</i>
86	452.1319	497.1309	7.80	2.12	ME	* LMPK12020047	Epicatechin 3-O-beta-D-allopyranoside	M+FA-H	C21H24O11	1.89	92.68		
87	770.0967	771.1327	7.85	2.16	ME	64	Di-o-galloyl-2,3-(S)-hexahydroxydiphenoyl-scylo-queritol	M+H	C34H26O21	3.6	95.23		<i>Rhus coriaria L</i>
88	448.1006	449.0893	7.98	1.05	ME	CHEBI:25091	Luteolin hexoside	M+H	C21H20O11	4.2	96.17	Antioxidant	<i>Rhus coriaria L</i>
89	618.0857	619.1150	7.98	3.27	ME	50	Di-o-galloyl-3,4-(S)-hexahydroxydiphenoyl protoquercitol	M+H	C27H22O17	3.4	91.55		<i>Rhus coriaria L</i>
90	284.0896	567.1732	8.16	2.50	ME	CHEBI:73235	Helicin	2M-H	C13H16O7	2.27	91.63	Metabolism	<i>Pimpinella anisum</i>
91	260.0685	259.0620	8.27	0.68	ME	* LMPK13110001	Khellin	M-H	C14H12O5	2.99	94.87	Antiinflammatory, autoimmunity, cytotoxic	<i>Ammi visnaga</i>
92	288.0634	269.0456	8.27	2.26	ME	LMPK12140618	Carthamidin	M-H2O-H, M-H	C15H12O6	0.32	93.77	Antineoplastic	<i>Carthamus tinctorius</i>
93	318.0376	319.0543	8.27	15.47	ME	* CHEBI:18152	Myricetin I	M+H	C15H10O8	-5.26	99.26	Antioxidant	<i>Rhus spp</i>
94	259.0930	304.0651	8.42	0.46	ME	CSID35031928	4-Carboxy-2-[(4-hydroxypropyl)amino]butanoate	M+2Na-H	C10H15N2O6	1.4	90.14	Metabolism	<i>Rhus spp</i>
95	594.1598	615.1001	8.42	7.68	ME	LMPK12110962	Luteolin 5-methyl ether 7-xylosyl-(1->6)-glucoside	M-H, M+Na-2H	C27H30O15	2.39	90.69	Antioxidant	<i>Rhus spp</i>
96	410.1366	449.1209	8.47	3.48	ME	* LMPK12050074	Preferrugone	M+K-2H	C23H22O7	6.27	99.18	Antioxidant	<i>Milletia spp</i>
97	464.0955	463.0881	8.47	21.80	ME	LMPK12112436	Myricitrin	M-H	C21H20O12	-0.25	95.99	Antioxidant	<i>Rhus spp</i>
98	286.0477	287.0639	8.48	6.06	ME	CHEBI:28499	Kaempferol	M+H	C15H10O6	2.8	92.73	Cytotoxic, antineoplastic, antioxidant	<i>Rhus spp</i>
99	170.0215	169.0142	8.52	3.11	ME	* CHEBI:30778	Gallic acid III	M-H	C7H6O5	-0.15	94.96	Antibacterial, antioxidant, cytotoxic	<i>Rhus spp</i>

100	260.0321	261.0473	8.52	1.89	ME		FDB030004	Mangiferin	M+H	C13H8O6	2.79	94.96	Antioxidant, antiinflammatory	<i>Rhus coriaria</i> L. <i>Rhus</i> spp.	
101	940.1182	469.0487	8.52	10.04	ME	*	CHEBI:18082	1,2,3,4,6-pentakis-O-galloyl-β-D-glucose I	M-2H	C41H32O26	-6.64	94.64			
102	636.0963	617.0804	8.52	4.73	ME	*	CHEBI:57815	Luteolin 7-O-[(β-D-glucosiduronate)-(1→2)-(β-D-glucosiduronate)]	M+H2O-H	C27H24O18	3.17	90.48	Antioxidant		
103	748.1487	771.1305	8.52	38.67	ME	*	LMPK12110568	Quercetin 3-(2"-galloylglucosyl)-(1->2)-alpha-L-arabinofuranoside	M+Na	C33H32O20	-9.85	98.61	Antioxidant	<i>Euphorbia pac</i> <i>hyriza</i>	
104	788.1021	769.0915	8.52	18.22	ME	*	CHEBI:17527	1,2,3,6-tetrakis-O-galloyl-β-D-glucose	M+H2O-H, M-2H	C34H28O22	-6.47	94.15			
105	940.1182	939.1078	8.52	147.58	ME	*	CHEBI:18082	1,2,3,4,6-pentakis-O-galloyl-β-D-glucose II	M-H	C41H32O26	-3.27	94.65		<i>Rhus</i> spp.	
106	954.1015	935.0837	8.52	4.98	ME	*	CHEBI:6065	Isoterchebin	M+H2O-H, M-H	C41H30O27	4.27	93.33	Antioxidant	<i>Cornus officinalis</i> <i>Rhus</i> spp	
107	302.0427	303.0587	8.60	15.17	ME	*	CHEBI:16243	Quercetin I	M+H	C15H10O7	2.67	94.87	Antioxidant, antiinflammatory, cytotoxic	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	
108	422.0849	467.0840	8.60	1.75	ME	*	CHEBI:6682	Mangiferin	M+FA-H	C19H18O11	2.02	93.69	Antioxidant		
109	180.1150	225.1131	8.65	0.87	AE	*	LMFA07040065	7E,10-undecadien-4-olide	M+FA-H	C11H16O2	-0.69	98.31			
110	302.0638	301.0565	8.73	6.88	AE	*	CSID30778511	Pyrogallol-2-O-glucuronide	M-H	C12H14O9	-0.03	98.05			
111	940.1182	469.0491	9.04	19.77	ME	*	CHEBI:18082	1,2,3,4,6-pentakis-O-galloyl-β-D-glucose III	M-2H	C41H32O26	-5.67	90.99		<i>Rhus</i> spp.	
112	462.2101	483.1879	9.09	1.50	AE	*	CHEBI:80904	Valerosidatum	M+Na-2H	C21H34O11	6.8	95.09	Citotoxic	<i>Centranthus longiflorus</i>	
113	1,092.1291	1091.1287	9.13	40.80	ME	*	CSID24784962	4-O-digalloyl-1,2,3,6-tetra-O-β-D-galloylglucose	M-H	C48H36O30	6.28	96.14			
114	572.0472	1189.0992	9.14	4.89	ME		LMPK12112392	Isorhamnetin 3-glucuronide-7-sulfate	2M+FA-H	C22H20O16S	5.72	96.38			
115	138.0316	183.0300	9.22	13.11	ME	*	CSID8438	Protocatechuic aldehyde	M+FA-H	C7H6O3	-1.02	98.30	Antiinflammatory, chemopreventive, antiapoptotic	<i>Rhus</i> spp	
116	286.0477	287.0639	9.22	6.98	ME		CHEBI:15864	Luteolin	M+H	C15H10O6	2.87	93.69	Antioxidant	<i>Rhus coriaria</i> L.	
117	286.0477	285.0410	9.27	3.04	ME		LMPK12111566	Fisetin I	M-H	C15H10O6	1.8	96.50	Antineoplastic, antioxidant	<i>Rhus</i> spp	
118	812.2375	833.2130	9.27	2.39	ME	*	LMPK12112605	Rhamnetin 3-rhamnosyl-(1->3)(4"-acetylramnosyl)(1->6)-galactoside	M+Na-2H	C36H44O21	1.003	97.61			
119	224.0559	257.0883	9.40	1.18	ME		CHEBI:58406	4-amino-4-deoxychorismate	M+CH3OH+H	C10H10NO5	-4.67	95.79	Metabolism	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
120	418.1264	463.1254	9.40	2.18	ME	*	LMPK12110623	4'-Hydroxy-3,5,6,7,3',5'-hexamethoxyflavone	M+FA-H	C21H22O9	1.92	92.79	Antioxidant		
121	320.0532	301.0335	9.45	1.63	ME	*	CHEBI:28917	Dihydromyricetin	M+H2O-H	C15H12O8	-5.78	99.30	Antioxidant		
122	256.1099	301.0799	9.45	1.56	ME		LMPK12020258	7-Hydroxy-5-methoxyflavan	M+2Na-H	C16H16O3	-4.62	90.68	Antibacterial	<i>Daemonorops draco</i>	
123	258.0890	303.0613	9.45	17.22	ME	*	CHEBI:5715	Hibiscoquinone A	M+2Na-H	C15H14O4	3.40	96.80	Antioxidant, chemopreventive	<i>Hibiscus</i> spp.	
124	448.1006	447.0932	9.45	10.21	ME	*	CSID4444112	Quercitrin	M-H	C21H20O11	-0.14	98.87	Antioxidant		
125	182.0215	545.0584	9.45	0.82	ME	*	CHEBI:31104	3,5-dihydroxyphenylglyoxylic acid	3M-H	C8H6O5	2.01	90.67	Antioxidant	<i>Rhus verniciflua</i>	
126	185.1528	203.1857	9.66	6.29	AE		CHEBI:55359	(R)-N-tert-butylpiperazine-2-carboxamide	M+NH4	C9H19N3O	-5.12	97.00	Metabolism	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
127	226.0994	271.0691	9.76	2.35	ME	*	LMPK12020227	7-Hydroxyflavan	M+2Na-H	C15H14O2	-6.44	95.25	Antidepressants, antineoplastic, antioxidant, antifungal	<i>Dracaena cinnabari</i>	
128	134.0691	179.0395	9.97	0.79	ME		CSID390176	Canaline	M+2Na-H	C4H10N2O3	-5.98	94.32	Antineoplastic, antibacterial, antiparasitary	<i>Canavalia ensiformis</i>	
129	334.0325	315.0155	9.97	0.81	ME	*	LMPK12113272	Hibiscetin	M+H2O-H	C15H10O9	2.51	96.86			
130	632.1013	613.0858	9.97	1.88	ME		LMPK12112464	Myricetin 7-(6"-galloylglucoside)	M+H2O-H	C28H24O17	3.56	96.95	Antioxidant		
131	616.1064	615.0987	9.97	31.97	ME	*	LMPK12112447	Myricetin 3-(4"-galloylramnoside)	M-H	C28H24O16	-0.73	98.49	Antioxidant		
132	298.0477	641.0981	9.97	3.06	ME	*	LMPK12050252	5-Hydroxypseudobaptigenin	2M+FA-H	C16H10O6	7.34	90.28			
133	236.0753	281.0741	10.02	1.77	ME		CHEBI:66940	Fructosylglycinate	M+H+H2O, M+2Na-H	C8H14NO7	-7.05	92.59	Metabolism		
134	318.0376	317.0312	10.02	1.04	ME		LMPK12110001	Myricetin II	M-H	C15H10O8	2.96	90.10	Antineoplastic, cytotoxic, antioxidant	<i>Rhus</i> spp	
135	303.0505	284.0336	10.20	2.27	ME	*	LMPK12010001	Delphinidin	M+H2O-H	C15H11O7	3.11	98.63	Antioxidant		
136	300.0634	299.0566	10.20	1.09	ME	*	LMPK12110728	6-Methyluteolin	M-H	C16H12O6	1.69	92.87	Antioxidant		
137	256.1099	301.0816	10.20	21.47	ME	*	LMPK12100067	Obtusainquinol	M+2Na-H	C16H16O3	1.98	94.79		<i>Dalbergia retusa</i>	
138	386.1002	431.0991	10.33	0.97	ME	*	LMPK12110152	Chrysin 5-xyloside	M+FA-H	C20H18O8	2.006	91.18			
139	314.0638	315.0971	10.33	3.01	ME	*	CHEBI:30997	Levogluconan gallate II	M+H	C13H14O9	8.07	95.25	Antioxidant	<i>Rhus coriaria</i> L.	
140	242.0943	287.0639	10.38	8.28	ME	*	LMPK12020233	7,4'-Dihydroxyflavan	M+2Na-H	C15H14O3	-6.3	96.97	Antibacterial, antifungal	<i>Broussonetia papyrifera</i> <i>Rhus</i> spp	
141	200.1049	445.2089	10.46	1.80	ME	*	LMFA01170045	4Z-Decenedioic acid	2M+FA-H	C10H16O4	2.56	91.19			
142	590.1272	589.1236	10.46	2.98	ME		LMPK12112075	Quercetin 3-(2"-3",4"-triacylgalactoside)	M-H	C27H26O15	6.34	95.02	Antioxidant		
143	256.0372	301.0357	10.94	0.76	ME	*	CHEBI:37486	anthrapurpurin	M+FA-H	C14H8O5	1.07	94.91	Antibacterial	<i>Rubia tinctorum</i> <i>Rhus</i> spp.	
144	562.1475	599.1060	10.94	7.88	ME	*	CSID35013429	Epifisetinidol-(4β->8)-catechin	M+K-2H	C30H26O11	17.22	97.11	Antioxidant		
145	198.0892	435.1415	11.07	1.57	ME	*	CSID9129733	(2E,4E)-2,7-Dimethyl-2,4-octadienedioic acid	2M+K	C10H14O4	-0.16	94.84	aldehyde dehydrogenase inhibitor	<i>Prunus persica</i>	
146	270.0528	269.0463	11.25	1.58	ME	*	CSID4444100	Apigenin	M-H	C15H10O5	2.69	95.09	Antioxidant	<i>Rhus</i> spp	
147	226.0994	271.0684	11.25	6.89	ME	*	CHEBI:79987	Favan-3-ol	M+2Na-H	C15H14O2	-9.41	97.56	Antioxidant, antithrombogenic, antiinflammatory	<i>Rhus</i> spp.	
148	244.1099	289.0818	11.69	1.08	ME	*	HMDB34723	Encelin	M+2Na-H	C15H16O3	2.85	93.38	Antitumor, antifungal	<i>Inula helenium</i>	
149	286.0477	287.0636	285.0411	11.92	29.54	ME	*	LMPK12111566	Fisetin II	M-H, M+H	C15H10O6	2.2	97.60	Antineoplastic, antioxidant, cytotoxic	<i>Rhus</i> spp

150	302.0427	301.0359	12.18	3.08	ME	*	LMPK12110004	Quercetin II	M-H	C15H10O7	1.65	93.82	Antineoplastic, antioxidant, cytotoxic	<i>Rhus spp</i>	
151	258.0892	303.0598	12.18	8.47	ME	*	CSID256612	5-Methoxyseselin	M+2Na-H	C15H14O4	-2.15	96.94	Antiinflammatory, antimicrobial	<i>Citrus grandis</i>	
152	272.1049	317.0758	12.49	1.47	ME	*	CSID148386	2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone	M+2Na-H	C16H16O4	-0.87	90.50	Chemopreventive, antitumor	<i>Greyia flanaganii</i>	
153	273.2744	274.2805	12.54	62.45	AE	*	LMFA01010048	Margaric acid	M+H	C17H31D3O2	-5.61	94.64	Antioxidant, antifungal	<i>Rhus typhina</i>	
154	282.2195	327.2183	12.54	5.10	ME	*	LMFA01050146	12S-hydroxy-16-heptadecyonic acid	M+FA-H	C17H30O3	1.98	98.06			
155	306.2559	351.2258	12.62	1.77	ME	*	LMFA01030383	7,11,14-Eicosatrienoic acid	M+2Na-H	C20H34O2	-3.98	91.24	Antioxidant, antiinflammatory	<i>Pinus spp</i>	
156	272.0685	273.0844	12.93	1.70	ME	*	CHEBI:3237	Butein	M+H	C15H12O5	2.93	94.84	Antineoplastic, antioxidant, cytotoxic	<i>Rhus coriaria L.</i>	
157	330.2406	329.2336	13.37	11.81	AE	*	CSID8034429	(-)-pinelllic acid	M-H	C18H34O5	0.59	96.74	Metabolism		
158	308.2715	353.2434	13.37	2.76	ME	*	LMFA01030130	11,14-eicosadienoic acid	M+2Na-H	C20H36O2	2.24	90.82	Antioxidant, antiinflammatory	<i>Rhus typhina</i>	
159	270.0528	271.0691	13.47	1.46	ME	*	CHEBI:18388	Apigenin	M+H	C15H10O5	0.16	97.89	Antioxidant	<i>Rhus coriaria L.</i>	
160	582.2101	581.2052	13.47	1.58	ME	*	CHEBI:86592	Budlenol A	M-H	C31H34O11	3.98	90.90	Citotoxic	<i>Hevea brasiliensis</i>	
161	262.1165	301.0800	13.60	2.75	ME	*	HMDB29437	Nopalnic acid	M+K	C10H18N2O6	1.408	97.82		<i>Rhus javanica</i>	
162	538.0900	539.1164	537.0851	13.91	7.05	ME	*	LMPK12040009	Amentoflavone	M+H, M-H	C30H18O10	4.38	91.38	Antioxidant, antiinflammatory	<i>Rhus spp</i>
163	194.0579	239.0564	14.48	1.27	ME	*	CHEBI:49057	(all-E)-deca-2,4,6,8-tetraenedioic acid	M+FA-H	C10H10O4	1.73	98.84			
164	122.0579	289.1123	14.66	1.11	ME	*	CSID192963	meso-Erythritol	2M+FA-H	C4H10O4	-7.11	98.73	Antioxidant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
165	364.2038	409.1758	15.94	2.14	AE	*	CSID10297786	3-(1,1-Dimethylallyl)-8-(3,3-dimethylallyl)xanthyletin	M+2Na-H	C24H28O3	2.05	94.52		<i>Ruta graveolens</i>	
166	118.0816	119.0884	17.62	1.21	ME	*	CSID7815	hexanethiol	M+H	C6H14S	-4.071	98.88			
167	367.3576	332.3427	17.70	15.66	ME	*	CHEBI:31014	lignocerate	M+H-2H2O	C24H47O2	-2.95	95.85			
168	243.1583	261.1912	17.93	4.46	ME	*	HMDB28959	Lysyl-Proline	M+NH4	C11H21N3O3	-3.83	95.53	Metabolism	<i>Allium sativum</i>	
169	140.1201	279.2343	19.35	6.53	ME	*	CSID4519242	3-Nonen-5-one	2M-H	C9H16O	4.87	95.33			
170	395.3889	360.3753	19.55	1.90	ME	*	CHEBI:31013	Cerotic acid	M+H-2H2O	C26H51O2	0.64	90.69		<i>Petiveria alliacea</i>	
171	505.3168	504.3118	19.60	0.94	ME	*	52925140	1-(11Z,14Z-eicosadienyl)-glycero-3-phosphoethanolamine	M-H	C25H48NO7P	4.34	91.42			
172	213.2093	277.2260	19.78	1.74	ME	*	LMFA08010012	Tridecanamide	M+ACN+Na	C13H27NO	4.45	95.73	Antiasthmatics, antiinflammatory, antineoplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
173	294.2195	293.2131	19.86	1.23	ME	*	LMFA02000239	17-hydroxy-linolenic acid	M-H	C18H30O3	2.94	92.15			
174	456.3603	455.3544	20.58	28.61	ME	*	CSID35013392	Sandosapogenol	M-H	C30H48O3	2.89	96.02		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
175	400.4069	439.3727	20.66	18.28	ME	*	LMST01040000	Stigmastane	M+K	C29H52	6.62	93.65	Antiinflammatory, antineoplastic	<i>Rhus javanica, Pistia stratiotes</i>	
176	296.2363	295.2287	21.28	6.44	ME	*	LMFA02000057	2R-hydroxy-linoleic acid	M-H2O-H, M-H	C18H32O3	4.19	98.29			
177	252.1725	522.3763	21.41	1.86	ME	*	HMDB35597	alpha-Carissanol	2M+NH4	C15H24O3	-5.17	96.11	Antioxidant, antineoplastic	<i>Carissa edulis</i>	
178	272.2351	293.2100	21.90	1.19	ME	*	LMFA01050190	5-hydroxy-hexadecanoic acid	M+Na-2H	C16H32O3	0.69	92.11			
179	316.0794	317.2200	21.90	3.07	ME	*	HMDB01856	Protocatechuic acid hexoside	M+H	C13H16O9	-5.63	91.25	Antioxidant	<i>Rhus coriaria L.</i>	
180	213.2093	277.2254	22.21	1.39	ME	*	LMFA08010012	Tridecanamide	M+ACN+Na	C13H27NO	1.69	93.39	Antiasthmatics, antiinflammatory, antineoplastic agents	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
181	237.1365	301.1507	22.34	25.70	AE	*	CHEBI:5351	Gigantine	M+ACN+Na	C13H19NO3	-6.42	98.77	Antibacterial	<i>Carnegieia gigantea</i>	
182	150.0528	449.1498	22.39	6.23	AE	*	CHEBI:131364	2,3,4-trihydroxypentanoic acid	3M-H	C5H10O5	-3.003	97.52			
183	150.0528	449.1495	23.80	5.83	AE	*	CHEBI:17173	D-ribose	3M-H	C5H10O5	-3.714	97.62	Estructural		
184	402.4226	441.3886	24.68	3.75	ME	*	LMFA11000470	6,9,12-Nonacosatriene	M+K	C29H54	7.302	90.49		<i>Musa paradisiaca L.</i>	
185	343.2723	385.3066	25.04	1.73	ME	*	LMFA08020101	N-palmitoyl serine	M+ACN+H	C19H37NO4	1.502	92.03	Antineoplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
186	296.3079	341.2784	25.12	1.67	ME	*	LMFA05000219	11E-Eicosen-1-ol	M+2Na-H	C20H40O	-2.16	97.57		<i>Simmondsia chinensis</i>	
187	110.0732	265.1485	25.74	23.71	AE	*	CSID13855	3-Methyl-2-cyclohexen-1-one	2M+FA-H	C7H10O	17.87	99.16		<i>Aerangis appendiculata</i>	
188	300.2664	299.2594	25.79	0.62	ME	*	CSID4472263	Hydroxyoctadecanoic acid	M-H	C18H36O3	0.8	97.60			
189	112.1252	283.2652	25.92	7.29	AE	*	CHEBI:88819	(Z)-2-Octene	2M+Hac-H	C8H16	4.22	92.69			
190	428.3654	473.3654	26.67	2.98	ME	*	LMST01040167	Saringosterol	M+FA-H	C29H48O2	4.07	92.81	Antiparasitary	<i>Strychnos spinosa</i>	
191	338.3185	377.2808	26.90	2.17	ME	*	LMFA01030403	19Z-docosenoic acid	M+K	C22H42O2	-2.33	97.67	Antioxidant		
192	400.4069	439.3731	27.21	5.23	ME	*	CHEBI:20673	5β-poriferastane	M+K	C29H52	7.602	93.99			
193	474.3709	473.3648	27.21	6.39	ME	*	CSID35013755	Priverogenin B	M-H	C30H50O4	2.51	97.55		<i>Primula veris</i>	
194	376.3310	399.3215	27.70	9.11	ME	*	LMFA07010539	(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrieryl decanoate	M+H, M+Na	C25H44O2	-8.21	92.72			
195	310.3236	355.2935	27.77	6.62	ME	*	LMFA12000220	Heineicosan-2-one	M+2Na-H	C21H42O	-4.029	95.51		<i>Crataegus spp</i>	
196	296.2351	277.2184	27.90	2.15	ME	*	LMFA02000155	alpha-artemismic acid	M-H2O-H	C18H32O3	3.66	97.35	Antiparasitary	<i>Artemisia annua</i>	
197	148.0736	355.1592	27.95	1.57	AE	*	CHEBI:32576	boivinose	2M+Hac-H	C6H12O4	-6.1	92.77		<i>Corchorus oltorius L.</i>	
198	372.0845	417.0548	27.95	17.88	AE	*	LMPK12113262	5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methyleneoxyflavone	M+2Na-H	C19H16O8	-2.24	90.17	Antineoplastic	<i>Melicope triphylla</i>	
199	210.2348	255.2333	28.01	9.10	ME	*	CSID24142	1-Pentadecene	M+FA-H	C15H30	1.5	98.32			
200	134.0215	135.1204	28.08	2.55	ME	*	CHEBI:6650	Malic acid II	M+H	C4H6O5	0.006	97.60		<i>Rhus coriaria L.</i>	

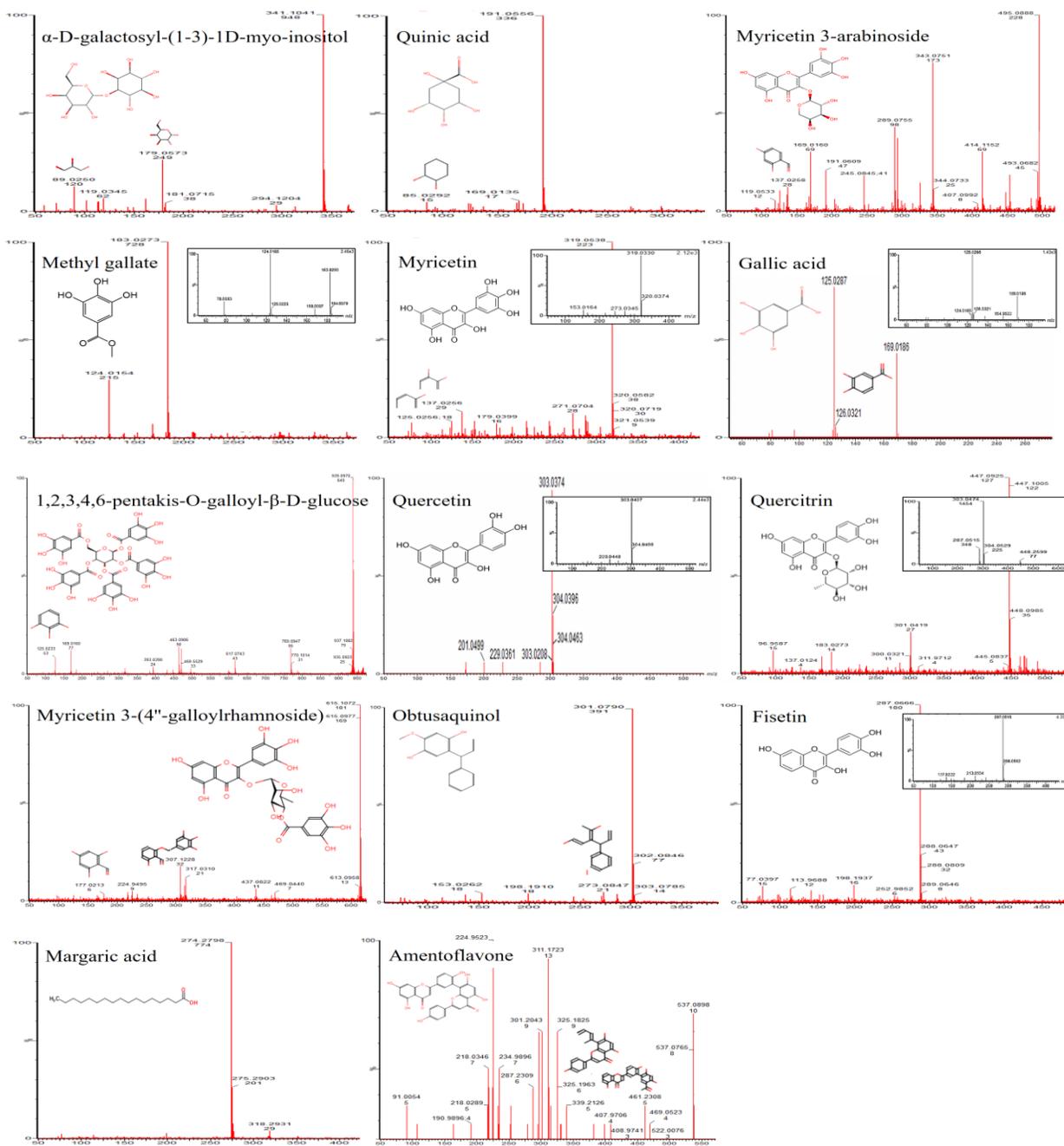
Compuestos más abundantes en EA o EM (verde), presente (rojo claro) o más abundante (rojo oscuro) en FA02 y aquellos presentes en ambas muestras (amarillo). (RT), tiempo de retención. (% Score), porcentaje de similitud con el compuesto reportado.

Apéndice 2. Análisis *MS/MS* de compuestos más abundantes en EM y EH de RHTR.



La figura muestra el patrón de fragmentación utilizado para identificar putativamente los compuestos más abundantes en EM y EH por comparación con los reportados en la plataforma de la biblioteca NIST.

Apéndice 3. Análisis *MS/MS* de compuestos más abundantes en EA y EM de RHTR.



La figura muestra el patrón de fragmentación utilizado para identificar putativamente los compuestos más abundantes en EA, EM y FA02 respectivamente, por comparación con los reportados en bases de datos para metabolómica de plantas con Progenesis® QI. El recuadro muestra la fragmentación de los compuestos estándar utilizados para corroborar la identificación.

15. ANEXOS.

Anexo 1. Aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV.



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO CICUAL-CINVESTAV

Fecha: 16 de junio de 2016

Director de Proyecto: Dra. Patricia Talamás Rohana

Departamento: Infectómica y Patogénesis Molecular

Título del Proyecto: "Producción de tumores en ratones nu/nu, empleando las líneas celulares cancerosas provenientes de pacientes mexicanas con cáncer de ovario"

Identificación del Proyecto: 184-16

Periodo de vigencia: 07 de marzo de 2016 a 06 de marzo de 2019.

Decisión del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio:

El Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, en su condición de entidad rectora para la revisión, aprobación, aprobación condicionada o negación de todos los protocolos de investigación que involucren el uso de animales de laboratorio, en cumplimiento de la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio" acuerda:

APROBAR este proyecto, pues el mismo cumple con los lineamientos para el uso de animales de experimentación establecidos en el PICUAL y la NOM.

Y para que así conste, se firma la presente el 16 de junio de 2016 en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Dr. José Manuel Hernández Hernández
Presidente del CICUAL-CINVESTAV

c.c.p. Archivo CICUAL

Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508 Col. San Pedro Zacatenco México, D.F. C.P. 07360
Tel.: 5747-3800 Fax: 5747-7002