



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia

“Efecto del extracto de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey y el híbrido H-387-07-GlSeM sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA
P R E S E N T A
ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ



Director de Tesis: Dr. Jorge Cadena Iñiguez.

Asesor Interno: Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo de la **DGAPA, UNAM PAPIIT (IN225610), ICyTDF (PICSA 10-156)** y el proyecto: "Evaluación de la actividad antitumoral de extractos crudos de *S. chinantlense* y *S. compositum* ubicados en el BANGESe", financiado por el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México, A.C. (**GISeM**) y el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (**SINAREFI-SNICS-SAGARPA**).

La investigación fue llevada bajo la dirección del Dr. Jorge Cadena Iñiguez y el Dr. Edelmiro Santiago Osorio con la colaboración del Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM), y en especial agradecimiento al Dr. Marco Soto Hernández, el Dr. Víctor Cisneros y a la Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez.

A los miembros del jurado integrado por la **M. en C. Catalina Machuca Rodríguez**, el **Dr. Jorge Cadena Iñiguez**, el **Dr. Edelmiro Santiago Osorio**, la **Dra. Maria de Lourdes Mora García** y la **Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez**; quienes con sus valiosas aportaciones enriquecieron y guiaron para la culminación exitosa del presente trabajo.

*A la **Vida**, por que la amo y me encanta disfrutarla.*

*A **Dios**, que me da la vida y fortaleza, gracias por todo.*

*A mi madre, **Socorro Martínez**, por darme la vida y ser mi guía en todo este tiempo, porque ella es mi ejemplo y siempre me abre sus brazos de amor y consejos. Le agradezco por el trabajo conjunto para que llegara hasta aquí y ser el motor que me impulsa, también es tu logro.*

*A mis hermanos, **Pedro Arturo, Ada Gabriela y Carlos Darío**, por ser mis compañeros de vida, los que le ponen la sal y pimienta, haciendo de éste camino especial. Por su particular apoyo en cada momento.*

*A mi padre, **Darío Rivera**, que me dio la vida y que con su apoyo fue accesible la culminación de mis estudios.*

*A mis amigas, **Ana Luz, Rebeca, Karla, Gris, Norma y Gaby** con quienes compartí, disfrute, aprendí y divertí en éste mismo sueño, las llevo en mi corazón.*

A todos y cada uno de los amigos y compañeros que conocí durante toda la carrera, a todos con los que estudie, trabaje, conocí y disfrute, a todos aquellos que fueron parte de mi camino y de mi vida, durante éste tiempo y que lo hicieron especial y al equipo de volibol.

*Al Dr. **Edelmiro** por su tiempo, paciencia, apoyo y guía; de igual forma a **Itzen** por enseñarme y su amistad, por la visión al grupo de trabajo.*

*A **Edgar Ledesma, Yolanda Córdova y Reynaldo Tiburcio** quienes me enseñaron, tuvieron paciencia, con quienes crecí en el laboratorio y sobre todo me brindaron su sincera amistad.*

A todos y cada uno con los que he compartido cada día, desde que entre al laboratorio, por su compañía y mutuo aprendizaje.

*A **Ricardo Mejía**, por su compañía, sus palabras, el impulso que me da cada día y por todo su apoyo, los cuales fueron fundamentales en esta recta final. Namaste.*

*A **Cencalli**, por recordarme y hacerme sentir que éste y todos los sueño son posibles.*

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
Introducción	4
- Cáncer	4
- Muerte celular	6
- Las plantas como alternativa antineoplásica	8
- <i>Sechium</i> spp.	10
Planteamiento del problema	15
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivo general	16
- Objetivos particulares	16
Método	17
Material vegetal.....	17
Preparación de los extractos.....	17
Dilución de los extractos.....	17
Líneas celulares.....	18
Cultivo celular.....	18
Ensayo de proliferación celular.....	19
Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.....	19
Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de sulfurodamina-B.....	19
Concentración de inhibición media (IC ₅₀).....	20
Evaluación de la viabilidad celular.....	20
Evaluación de cuerpos apoptóticos por morfología.....	20
Manejo de datos.....	21

Resultados	22
– Evaluación del efecto de los extractos sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929 con la técnica de cristal violeta.....	22
– Evaluación del efecto de los extractos sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929 con la técnica de sulforodamina-B (SRB).....	30
– Determinación de la concentración de inhibición media (IC ₅₀) de los extractos para la línea celular HeLa y L929.....	35
– Evaluación del efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular HeLa y L929.....	37
– Evaluación del efecto de los extractos sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular HeLa y L929.....	40
Discusión	45
Conclusiones	49
Bibliografía	50
Apéndice A	59
Apéndice B	64
Apéndice C	67

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
Ara-C	Citarabina
ATCC	Del Inglés: American Type Culture Collection
BANGESe	Banco Nacional de Germoplasma de chayote <i>Sechium edule</i> en México
°C	Grados centígrados
CD1	Cepa de ratón CD1
CO ₂	Dióxido de Carbono
C3H/An	Cepa de ratón C3H/An
GISeM	Grupo Interdisciplinario de Investigación en <i>Sechium edule</i> en México
CRUO-UACH	Centro Regional Universitario Oriente-Universidad Autónoma de Chapingo
HeLa	Línea celular cancerígena de adenocarcinoma de cérvix humano
IC ₅₀	Concentración de inhibición media
IMDM	Del Inglés: Iscove's Modified Dulbeco's Médium
Kg	Kilogramo
L-929	Línea celular cancerígena de fibrosarcoma de pulmón de ratón
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometros

PBS	Del Inglés: Phosphates Buffer Solution
P388	Línea celular de leucemia mieloide de ratón
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SPSS	Del Inglés: Statistical Package for the Social Sciences
s/e	Sin espinas
TRIS	Del Inglés: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
var	Variedad
VPH	Virus de Papiloma Humano

Resumen

A nivel mundial el cáncer es la primera causa de muerte entre la población con más de 21 mil muertes al día aún con los tratamientos actuales para combatir dicha enfermedad; en México, únicamente para el año 2008, se han registrado hasta 71 mil 074 decesos a causa de algún tipo de cáncer. Por lo anterior resalta la importancia de fortalecer las investigaciones que conduzcan al establecimiento de tratamientos alternativos o complementarios. Los productos naturales son utilizados para la obtención de agentes medicinales y como un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Dentro de las plantas poco estudiadas se encuentran las del género *Sechium*, llamados comúnmente "chayotes". En este trabajo se evaluó el efecto de los extractos de *Sechium chinantlense*, *Sechium compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM, sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales humanas HeLa y L929. Se encontró que dichos extractos reducen la proliferación de forma dosis-dependiente y presentan en promedio una IC_{50} experimental de 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para HeLa y 3.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para L929, siendo claramente afectada la viabilidad ya que las células presentan cuerpos apoptóticos. Los resultados indican que las especies estudiadas aquí resultan ser más contundentes en comparación a lo reportado para cualquier variedad de *Sechium edule*, además si se considera que la inducción a la apoptosis es deseable para una molécula antitumoral por reducir los efectos citotóxicos no deseados, incluyendo que las IC_{50} encontradas para los extractos y líneas celulares, sugieren un alto potencial antitumoral de acuerdo al NCI, ya que los valores corresponden al rango de actividad antineoplásica como si se tratara de moléculas puras (menos de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Introducción

Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública creciente a nivel mundial y afecta a personas de todas las edades. El cáncer es una enfermedad producida por diversos cambios en la conducta de las células que surgen por modificaciones en la información genética, debido a lo cual éstas células proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva destruyendo tejidos y órganos normales (Karp, 1998). Tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Yocota, 2000), tales como, la radiación ultravioleta, emisiones radiactivas, infecciones recurrentes con organismos patógenos, exposición a compuestos químicos carcinogénicos (Weinberg, 1996), daños en el sistema inmune, desequilibrio endocrino, edad y condiciones fisiológicas del organismo.

Para la diseminación de las células de un tumor sólido típico, éstas deben ser capaces de disminuir su adhesión, escapar del tejido de origen, atravesar otros tejidos hasta llegar a un vaso sanguíneo o linfático, cruzar la lamina basal y el revestimiento endotelial del vaso para entrar a la circulación, para posteriormente salir de la circulación en otra parte del cuerpo, sobrevivir y proliferar en el nuevo entorno en el que se encuentre, siguiendo un proceso similar al que sufrieron en el tumor primario (Alberts *et al.*, 2002).

El cáncer se clasifican de acuerdo al tipo de tejido donde progresa, tales como, **sarcomas** procedentes de tejido conjuntivo (huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos), tejido muscular y tejido adiposo; os **carcinomas**, que provienen de tejido epitelial (piel y epitelios que recubren las cavidades y órganos), y finalmente las **leucemias y linfomas** cuyo origen es en el tejido hematopoyético (tejido formador de

células sanguíneas) y linfoide, que producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y medula ósea. Algunos ejemplos de tumores malignos son el fibrosarcoma de pulmón, leucemias y carcinoma de cérvix (Pardo, 1998).

A nivel mundial el cáncer es la primera causa de muerte entre la población, seguida por las enfermedades cardiovasculares. En 2007 alrededor del mundo murieron 7.9 millones de personas a causa de algún tipo de cáncer lo que representó el 13 % de las defunciones generales (INEGI, 2010), es decir más de 21 mil muertes al día. En México, fallecieron 71 mil 074 personas a causa de algún tipo de cáncer durante 2008 (INEGI, 2010), y de acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se espera que las muertes por neoplasias sigan en aumento y alcancen 12 millones de casos para el 2030 (WHO, 2007).

Las diferencias biológicas, así como el grado de exposición a factores de riesgo hacen que algunos tipos de cáncer se desarrollen de forma diferenciada entre mujeres y hombres. Debido a esto, en México, durante los últimos diez años las mujeres presentaron los mayores porcentajes de muertes por neoplasias en comparación con los hombres, siendo en mujeres el cáncer de cuello del útero y mama, las dos primeras causas, así como el cáncer de próstata y tráquea, bronquios y pulmón para hombres (INEGI, 2010).

El tratamiento del cáncer varía según el tipo y estado del mismo; para lo cual la medicina aplica diferentes procedimientos para intentar curarlo. La cirugía es uno de estos procedimientos, y consiste en la extracción del cáncer por medio de una operación, la cual depende del lugar y tamaño del tumor, con efectos secundarios como dolor y cansancio según sea el tipo de cirugía (NCI, 2008). Otros como la radioterapia referido a la aplicación de radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerígenas en un área determinada, es aplicada de forma externa en dirección al área del tumor, o interna por medio de agujas o catéteres que contienen las sustancias radioactivas. Los efectos secundarios son cansancio, abatimiento del sistema inmune, pérdida de pelo, así como,

enrojecimiento, resequedad y sensibilidad en la piel (NCI, 2008).

La quimioterapia es otro método de combate al cáncer y se utilizan medicamentos para eliminar las células cancerígenas en todo el cuerpo, sin embargo, las células sanas también pueden ser dañadas, presentando efectos secundarios como inmunosupresión, pérdida de apetito y pelo, fatiga, náuseas, vómito, diarrea y llagas en la boca (NCI, 2008).

Todos los tratamientos, en general, tienen por objetivo eliminar a las células cancerígenas llevándolas a iniciar algún proceso de muerte celular, pero afectan de igual forma a las células sanas provocando finalmente y en conjunto los efectos secundarios.

Muerte celular

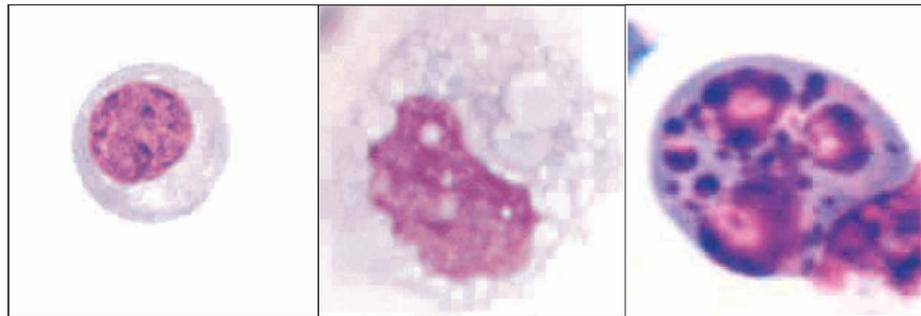
En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis celular mantiene el estado de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación y su tiempo de vida, de acuerdo con las necesidades del organismo, eliminando aquellas que han cumplido sus funciones, o que están dañadas ya sea a nivel celular o genético. De esta manera la muerte celular toma un papel fundamental para el equilibrio fisiológico del organismo (Jiménez, 2003), ya que se trata de una muerte celular programada, un "suicidio" celular codificado genéticamente, que se activa cuando la célula no es necesaria por más tiempo o cuando ha sido lesionada de forma severa.

Existen diferentes tipos de muerte celular siendo las más comunes, la necrosis y la apoptosis. Aunque estos dos tipos de muerte tienen algunas características en común, presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica, de esta forma es posible identificar cada mecanismo de muerte celular (Dubin *et al.*, 2000). Ambos mecanismos pueden presentarse y combinarse en situaciones de muerte celular masiva, sin embargo, cuando la cantidad de células a eliminar excede la capacidad de fagocitosis por células vecinas, se genera una acumulación de restos de células apoptóticas sin poder ser degradadas, ocasionando un proceso denominado necrosis secundaria.

La necrosis es un fenómeno degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, puede ser consecuencia de un trauma ambiental como temperaturas extremas, isquemia, daño mecánico y generalmente como respuesta a una lesión grave (Fink *et al.*, 2005). Evento que se caracteriza por hinchamiento celular y posterior estallamiento cuyo contenido citoplasmático es liberado a la matriz extracelular induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Alfaro *et al.*, 2000; Kroemer *et al.*, 2005) (Figura 1).

El término de apoptosis es usado para describir la muerte celular programada, ya que desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias. La apoptosis no se da de forma aleatoria, sino que se trata de un proceso activo bien definido genéticamente, en el que las células están destinadas a morir en un tiempo determinado (Jordán, 2003). Este proceso es dinámico en donde aparecen múltiples eventos en diferentes momentos, y puede ser activado por factores intrínsecos y extrínsecos. La apoptosis contribuye a dar forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autoreactivas, infectadas y las genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente dañina para el organismo (Potten *et al.*, 2004).

En los primeros estudios, la apoptosis fue descrita en base a características morfológicas que presentaban las células (Alfaro *et al.*, 2000; Potten *et al.*, 2004). Los cambios morfológicos que se producen mediante la apoptosis se pueden identificar mediante la microscopía óptica o electrónica. Uno de los eventos tempranos es la contracción celular ocasionando compactación de orgánulos y citoplasma más denso. También se observa picnosis, que es el resultado de la condensación de la cromatina. Posteriormente los orgánulos al igual que el material genético se encapsulan en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos (Figura 1), y estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células del sistema inmune natural, de esta manera no se genera una respuesta inflamatoria como en la necrosis (Jordán, 2003; Zalacain *et al.*, 2005; Fenech, 2007; Li *et al.*, 2008).



Célula mononucleada

Necrosis temprana

Apoptosis tardía

Figura 1. Diferencias morfológicas entre células normales, necróticas y apoptóticas. Tomado y modificado de Fenech (2007).

Las plantas como alternativa antineoplásica

En la actualidad se ha incrementado la necesidad de fortalecer las investigaciones de tratamientos alternativos o complementarios, con el fin de mitigar los efectos secundarios y alcanzar mayores niveles de especificidad y eficacia para el tratamiento del cáncer. A este respecto, los productos naturales son utilizados por el hombre para la obtención de agentes medicinales (Setzer *et al.*, 2003), usando como fuente de dichos compuestos a las plantas, representando un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Resulta altamente significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos, aproximadamente el 67 % de estos son derivados en una u otra forma de fuentes naturales, incluyendo plantas (Vega *et al.*, 2006), y se estima que en el mundo se utilizan unas 10,000 especies vegetales como medicinales, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional, de las cuales, sólo un número relativamente reducido se emplea en un volumen significativo (Cañigüeral *et al.*, 2003).

Este retorno progresivo hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica ha sido estimulado, en parte, por el regreso a lo natural que se ha producido en forma genérica en la sociedad, debido al descubrimiento de efectos adversos en fármacos de

síntesis química, esto aunado al mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados, el desarrollo de nuevos métodos analíticos puestos a disposición del control de calidad y el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración (Cañigüeral *et al.*, 2003).

El valor medicinal de las plantas está dado por sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios (Bye *et al.*, 1992), que producen efectos fisiológicos y que en la naturaleza tienen la función de defensa química contra la herbivoría (Tallamy *et al.*, 1989), los cuales a menudo muestran una gran complejidad estructural que puede determinar su actividad biológica, dichos compuestos son obtenidos de las plantas por destilación o extracción con disolventes orgánicos; representando un enorme recurso científico y clínico para el desarrollo de nuevos fármacos (Balandrin *et al.*, 1985; Hostettmann *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 2005).

Dentro del grupo de drogas anticancerígenas derivadas de plantas actualmente en uso clínico, se encuentran seis principales clases de compuestos (incluyendo sus derivados sintéticos y semi-sintéticos): alcaloides vinca, epipodofilotoxinas, taxanos, camptotecinas, homoharringtoninas y elipticinas (Balunas *et al.*, 2005, Vega *et al.*, 2006), muchas de ellas encontradas en las plantas basadas en los conocimientos de la etnomedicina, sin embargo, cerca del 58% de especies de plantas empleadas en la etnomedicina no se han examinado su composición química o actividad biológica (Vega *et al.*, 2006).

Sechium spp.

Dentro de las plantas poco estudiadas se encuentran las especies del género *Sechium* spp, de la familia Cucurbitaceae, llamados comúnmente "chayotes". Es una de las familias botánicas de gran importancia para las culturas de Mesoamérica, por ser éste su centro de origen y por la diversidad de especies integradas a la dieta y medicina (Ortega-Paczka *et al.*, 1998). De las especies neotropicales de la familia presentes en México, sobresale *Sechium edule* (Jacq.) Sw., siendo México uno de los centros de mayor diversidad biológica (Newstrom, 1991; Ortega-Paczka *et al.*, 1998).

Durante muchos años se pensó que *Sechium* era un género monotípico, cuya única especie era *Sechium edule* (Jacq.) Sw., recientemente se acepta que dentro del género hay diez especies, ocho silvestres (*S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*) y dos cultivadas (*S. edule* y *S. tacaco*) con distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996; Cross, 2003).

Lira-Saade en 1996, realizó una recopilación de datos donde describe la taxonomía, el origen, los usos, la ecología, las características biológicas y agronómicas, áreas de producción y consumo de *S. edule* y la descripción de *S. hintonii*, *S. compositum* y *S. chinantlense*. Teniendo como una peculiar característica que los frutos silvestres son de sabor amargo y los de plantas domesticadas no (Lira-Saade *et al.*, 1999). México

presenta la mayor variación morfológica la cual se distingue principalmente en sus frutos con diferentes dimensiones, colores, formas, sabor, ausencia, presencia y densidad de espinas, así como, polimorfismo de hojas (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). Recientemente se han clasificado 10 grupos varietales, con base en caracteres morfoestructurales, fisiológicos, químicos y genéticos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). Debido a que en la naturaleza ocurren hibridaciones, recientemente el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM), detectó el linaje genético del híbrido H-387-07-GISeM producto de los

cruzamientos entre las variedades: *Sechium edule* var. *virens levis* por *Sechium edule* var. *amarus silvestrys* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (GISeM, 2008) (Figura 2).

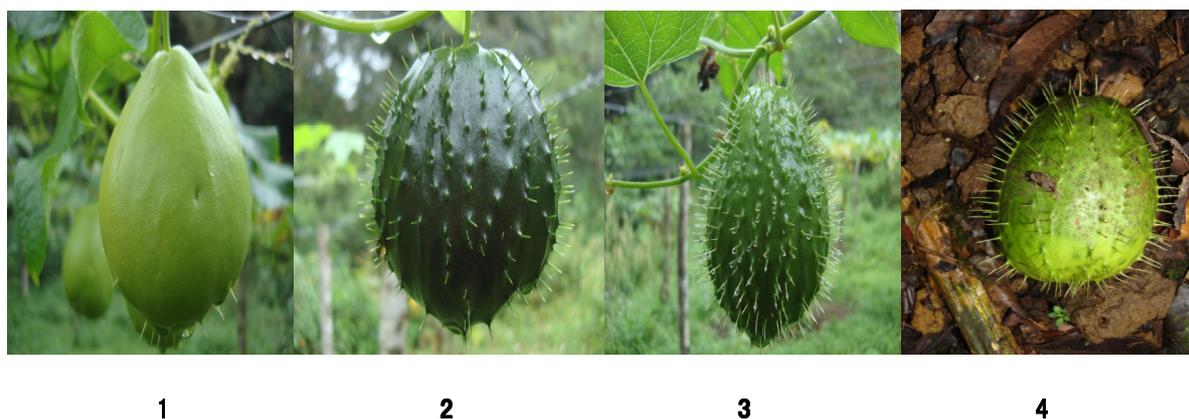


Figura 2. Linaje del híbrido H-387-07-GISeM: 1: *Sechium edule* var. *virens levis*, 2: *Sechium edule* var. *amarus silvestrys*, 3: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, 4: Híbrido H-387-07-GISeM.

Otra especie de este género es ***Sechium chinantlense*** Lira & F. Chiang., (Figura 3), una planta endémica de una pequeña región de México, en el norte de Oaxaca, cerca de Veracruz denominada la Chinantla, se encuentra en áreas con alta humedad y altitudes desde 20 a 800 m; es conocido como: cabeza de chango, chayote cimarrón y chayote de monte, aunque se reporta la existencia de una variedad con espinas (Lira-Saade, 1996). De igual forma, la especie ***Sechium compositum*** (Donn. Sm.) C. Jeffrey., (Figura 3) se encuentra en algunas partes del sureste de Chiapas y Guatemala, en un rango de altitud que va de 50-2100 m, frecuentemente crecen en plantaciones de café, y es conocido como: chayote de caballo (Lira-Saade, 1996).



Figura 3. Frutos en madurez hortícola de chayotes silvestres. A: *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., B: *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey.

De todos los chayotes en mención, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. es el de mayor importancia para el hombre debido a su uso alimentario y medicina tradicional, ya que los frutos y las semillas son ricos en varios aminoácidos como: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cisteína, glicina, prolina, serina, tirosina y treonina, además de contener siete de los nueve aminoácidos esenciales (lisina, leucina, metionina, fenilalanina, valina, isoleucina, histidina). Algunas de estas características hacen al chayote particularmente apropiado para la dieta en hospitales (Flores, 1989).

Otros estudios realizados con frutos, hojas y semillas de chayote han revelado su actividad diurética (Jensen *et al.*, 1986), anti-inflamatoria (Salama *et al.*, 1986) e hipotensora (Cambar *et al.*, 1980; Guppy *et al.*, 2000), antimutagénica (Yen *et al.*, 2001), antibacteriana (Ordoñez *et al.*, 2003), ayuda a la eliminación de cálculos renales, es utilizado como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour *et al.*, 2002), alivia la inflamación intestinal y cutánea además de favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que *Sechium edule* (Jacq.) Sw. contiene peroxidases, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides y cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, anti-oxidantes, antiviral y efectos antitumorales (Salama *et al.*, 1986; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2004 y Ordoñez *et al.*, 2006), incluso Wu *et al.* (1998), caracterizaron a la proteína *sechiumina* del extracto acuoso de la semilla, la cual tiene propiedades de inactivación ribosomal y podría ser un posible agente quimioterapéutico.

Se ha reportado que los extractos crudos de cinco variedades de chayote tienen potencial antiproliferativo sobre las líneas celulares tumorales L929 y P388, donde los extractos de las variedades botánicas *Sechium edule* var. *amarus silvestrys* y var. *nigrum spinosum* tuvieron un mejor efecto, de tipo dosis dependiente (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó el estudio con ocho variedades de *S. edule*, donde se registró que los extractos alcohólicos de los frutos de las variedades var. *amarus silvestrys*, var. *nigrum spinosum*, var. *virens levis*, var. *nigrum xalapensis* y var. *albus levis* presentan actividad citotóxica en la proliferación de las líneas celulares L929 y P388 y que el extracto de var. *albus minor* y var. *albus dulcis* no inhibe la proliferación (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007; Salas *et al.*, 2007). Recientemente se evaluaron las mismas ocho variedades de *S. edule* (Jacq.) Sw., sobre la proliferación de la línea celular HeLa, donde las var. *albus levis* y *virens levis* tienen mayor potencial antiproliferativo (Rivera, 2010). Sosa (2008), evaluó los extractos acuoso, metanólico y etanólico de *S. edule* (Jacq.) Sw. var. *nigrum spinosum* (Figura 2) en las líneas HeLa y L929, donde concluye que los extractos metanólico y etanólico son los que tienen actividad antiproliferativa y citotóxica de forma dosis-dependiente sobre la línea celular L929. Posteriormente Monroy-Vázquez (2009), confirma dicha actividad y adicionalmente menciona haber obtenido cuatro fracciones de dicho extracto, de las cuales tres presentaron actividad antiproliferativa similar; siendo la 5-7 la de mayor actividad y especificidad sobre HeLa desde dosis bajas, indicando que los componentes químicos de dicha fracción, correspondieron al grupo de ésteres de ácidos grasos saturados; ampliando la gama de metabolitos y fuentes de especies vegetales con actividad antineoplásica.

Por lo anterior es claro que no todas las variedades de *S. edule* (Jacq.) Sw. tienen el mismo potencial de inhibir la proliferación de células tumorales, en este estudio se analiza si los extractos de especies diferentes a ésta y el híbrido también inhiben la proliferación celular.

Planteamiento del problema

Extractos alcohólicos de ocho diferentes variedades de *S. edule* (Jacq.) Sw. tienen efecto antiproliferativo diferencial en las líneas celulares cancerígenas L929 y P388, pero se desconoce si otras especies de chayote o híbridos presenten un efecto biológico similar. En este trabajo se analizará el potencial antiproliferativo, viabilidad celular e inducción de apoptosis de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISem, sobre líneas celulares.

Justificación

En México el cáncer ocupa el tercer lugar como causa de muerte, cada año se diagnostican 100 mil nuevos casos y 61 mil decesos (INEGI, 2008) a pesar de los avances terapéuticos como la quimioterapia, radioterapia y la cirugía. Pero en muchos de los casos la reincidencia de la enfermedad, la falta de selectividad de los agentes anticancerígenos y la resistencia desarrollada por las células cancerígenas a dichos compuestos (Setzer *et al.*, 2003), lleva a la creciente necesidad de buscar nuevos compuestos de origen vegetal con mayor especificidad y menor agresividad hacia las células normales y por tanto a la salud del paciente, así como un menor costo económico. Por ello, los compuestos fitoquímicos han sido investigados, proporcionando nuevas opciones para la industria farmacéutica (Cordell *et al.*, 1993; Mans *et al.*, 2000). Actualmente el 60 % de los medicamentos anticancerígenos provienen de fuentes naturales (Cragg *et al.*, 2005). Debido a esto se ha incrementado el estudio de extractos vegetales. En estudios recientes se ha encontrado que ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., tienen diferente actividad antiproliferativa dependiendo de la célula tumoral, por ello es necesario ampliar la evaluación de la actividad en otras especies de chayote, incluso los parientes silvestres del género, para ampliar la gama de posibilidad con mayor potencial antitumoral sobre las líneas cancerígenas, a través de nuevos principios activos de origen natural que amplíen las opciones farmacológicas y que puedan formar parte de medicamentos alternativos, a partir de la biodiversidad local.

Hipótesis

Si los extractos alcohólicos de las diferentes variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., así como los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de la variedad *nigrum spinosum*, han presentado un efecto antiproliferativo y citotóxico en diferentes líneas celulares, se espera que *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISeM inhiban la proliferación sobre las líneas celulares HeLa y L929 de manera similar.

Objetivo general

Evaluar los extractos de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISeM, sobre la proliferación de las líneas celulares HeLa y L929.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de los extractos sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929.
- Determinar la concentración de inhibición media (IC_{50}) de los extractos para las líneas HeLa y L929.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular HeLa y L929.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la formación de cuerpos apoptóticos en las líneas celulares HeLa y L929.

Método

Material vegetal

Se usaron frutos de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey y el híbrido H-387-07-GISeM producto de los cruzamientos entre las variedades: *Sechium edule* var. *virens levis* por *Sechium edule* var. *amarus silvestrys* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (GISeM, 2008) (Figura 2 y 3); obtenidos por el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM), procedentes del Banco Nacional de Germoplasma de chayote *Sechium edule* (BANGeSe), GISeM-CRUO-UACH, en madurez hortícola (Watada *et al.*, 1984).

Preparación de los extractos

Los frutos se cortaron en trozos pequeños, secados a 50 °C con circulación de aire y macerados para estandarizar el tamaño de partícula. La muestra procesada incluyó siempre la epidermis, espinas y semilla. Se empleó 1 Kg de fruto en estado seco y fresco los cuales se sometieron a una extracción discontinua con etanol al 96 % con siete cambios de disolvente el cual se evaporó a presión reducida para obtener el extracto etanólico crudo seco.

Dilución de extractos.

Se pesaron en todos los casos 71.2 mg de extracto crudo para ser diluidos en 40 µL de etanol y se aforan a 1 mL con PBS (Apéndice B) y homogeneizan usando un vórtex (Scientific Industries, Bohemia, NY., USA). La solución patrón de extracto así obtenida se centrifugó (Beckman, TJ-6, USA) a 2000 rpm por 5 min., se utilizó solo el sobrenadante para su dilución según las concentraciones necesarias. Todas las preparaciones se almacenaron a 4 °C (Apéndice A).

Líneas celulares

La búsqueda de nuevas drogas antineoplásicas se ha facilitado debido al establecimiento de modelos de estudios basados en líneas celulares cancerígenas, entre las más empleadas son la línea celular HeLa que es un adenocarcinoma de tejido epitelial del cérvix proveniente de una mujer de raza negra de 31 años, establecida en 1951 por Scherer, su morfología es de tipo epitelial, son adherentes, se ha reportado que contiene secuencias de VPH 18 (ATCC). La línea celular L929, establecida por Earle en 1948, proveniente de un fibrosarcoma de pulmón de un ratón macho de la cepa C3H/An, de tejido conectivo subcutáneo areolar y adiposo, su morfología es de tipo fibroblasto, son adherentes, expresan el antígeno H-2K (ATCC). Ambas líneas celulares tumorales fueron empleadas en el presente estudio. También se utilizó como un control de células normales a los fibroblastos de pulmón de ratón de la cepa CD/1 que fueron obtenidos en el laboratorio para el presente estudio. Se obtuvieron cortando trozos muy pequeños de pulmón en condiciones de esterilidad y colocándolos en una caja petri de vidrio en las condiciones de cultivo abajo descritas. Se realizó cambio de medio conforme el cultivo progresa y al presentar una densidad celular estable se retiraron los restos de tejido y se procedió al proceso de resiembra. El manejo de estas células fue igual al de las líneas celulares tumorales.

Cultivo celular

Las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) de Invitrogen GIBCO-BRL., suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) desactivado (Invitrogen GIBCO-BRL HyClone) (Apéndice B), en cajas petri de vidrio con capacidad de 5 mL a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ y 95 % de humedad dentro de una incubadora (Thermo Forma, USA). Con una densidad de 1 x 10⁵ células/mL. Cada 48 horas alcanzan un promedio de 70 % de saturación momento en que son sembradas (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan *et al.*, 1993) (Apéndice A).

Ensayo de proliferación celular.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la proliferación de células tumorales, se obtuvieron 2×10^4 células/mL de las líneas tumorales, que fueron cultivadas por 72 horas en 200 μ L de medio de cultivo y suero para cada pozo en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA) con 0.0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL de extracto (Apéndice A).

Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.

Transcurridas las 72 horas de incubación, la proliferación celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta propuesta por Gillies *et al.*, 1986. En la cual se tiñe el ADN del núcleo de las células y es considerado un parámetro indirecto para cuantificar número celular. Brevemente, se fijan las células por una hora con 50 μ L/pozo de glutaraldehído al 1.1 % de agua destilada, se retira y se tiñen con 50 μ L/pozo de cristal violeta (Apéndice B), se enjuaga con agua destilada, posteriormente adicionar 50 μ L/pozo de ácido acético 10 % y agitar 20 minutos, finalmente la densidad óptica se evaluó a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria). Los resultados obtenidos se graficaron como porcentaje de proliferación con respecto al control (Apéndice A).

Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de sulforodamina-B.

Las células se cultivaron por 72 horas bajo las condiciones antes mencionadas; en cantidades de 200 μ L de medio y suero/pozo en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA) con diferentes dosis de extracto. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células fueron evaluadas por la técnica de Sulforodamina-B, propuesta por Skehan *et al.*, 1990. Donde el colorante se adhiere a los aminoácidos de las proteínas celulares y la valoración colorimétrica da una estimación de la masa total de proteínas, las cuales están relacionadas con el número celular. Dicha técnica consiste en fijar las células por dos horas en refrigeración con 32 μ L/pozo de ácido tricloroacético 50 %, se lavan con agua destilada y se dejan secar para teñir con 50 μ L/pozo de Sulforodamina-B 4 % (en ácido acético al 1 %) (Apéndice B), se lavan con ácido acético 1 % y se dejan secar, se adicionan 50 μ L/pozo de TRIS Base 10 mM y agitar 20 minutos para finalmente leer la

densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria). Los resultados obtenidos se convierten a porcentaje de proliferación con respecto al control (Apéndice A).

Concentración de inhibición media (IC₅₀)

Para determinar la concentración necesaria de los extractos para inhibir la proliferación celular en un 50 % (IC₅₀) de cada línea celular, se empleó la ecuación de regresión lineal, de la curva dosis-respuesta de proliferación correspondiente a las líneas celulares tratada con cada extracto de chayote (Apéndice C).

Evaluación de la viabilidad celular

Las células se cultivaron por 72 horas bajo las condiciones antes mencionadas; en cantidades de 200 µL de medio y suero /pozo en placas de 96 pozos fondo plano ultra baja adherencia (Costar, Cambridge, MA, USA) con diferentes dosis de extracto. Transcurrido el tiempo se realizó conteo directo con hemocitómetro y por exclusión de azul tripano; el cual entra a las células que presentan daño en la membrana tiñendo el núcleo de azul, las cuales ya no son consideradas viables.

Evaluación de cuerpos apoptóticos por morfología.

La aparición de cuerpos apoptóticos son estrategias vigentes para detectar en forma sencilla y barata la inducción de muerte por apoptosis (Elmore, 2007; Fenech, 2007; Ling *et al.*, 1993), Para ello, se obtuvieron 1×10^5 células/mL de las líneas HeLa, L929 y fibroblastos normales, que fueron cultivadas por 48 horas en 1000 µL de medio de cultivo y suero para cada pozo en placas de 24 pozos fondo plano ultra baja adherencia (Costar, Cambridge, MA, USA), con ó sin la IC₅₀ de los diferentes extractos para cada línea celular. Transcurrido el tiempo se colectaron las células y se colocaron en un portaobjetos, posteriormente se fijó con 1 mL de metanol y se tiñó con el colorante Giemsa al 10 %.

Se observó al microscopio (Carl Zeiss, Primo Star, Germany), equipado con un lente de objetivo 100x. Los cambios morfológicos como disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, la pérdida de la regularidad de la membrana celular fueron parámetros citomorfológicos evaluados en la formación de cuerpos apoptóticos. Se contaron 200 células de cada experimento para obtener el porcentaje de células normales y apoptóticas.

Manejo de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con tres repeticiones por condición. Todos los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de cada grupo. Para la diferencia estadísticamente significativa entre los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey y Dunnet con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$) mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 10.0 para Windows 98.

Resultados

Evaluación del efecto de los extractos sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929 con la técnica de cristal violeta.

Establecimiento de la curva dosis respuesta.

Previamente se mostró que dosis de 0, 40, 230, 470, 1180 y 2370 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de *Sechium edule* inhibe la proliferación de la línea celular de fibrosarcoma de pulmón de ratón L929 en forma dosis dependiente, por lo que se decidió emplear las mismas concentraciones para evaluar el efecto de los extractos de especies silvestres de chayote y el híbrido en la línea celular L929, fibroblastos normales de pulmón de ratón, así como en la línea celular de cáncer de cérvix humano HeLa. En estas condiciones, primero se probó el extracto del híbrido H-387-07-GISeM sobre HeLa y L929 donde los datos muestran que todas las dosis bloquean, con efectividad similar, la proliferación en ambas líneas (Figura 4).

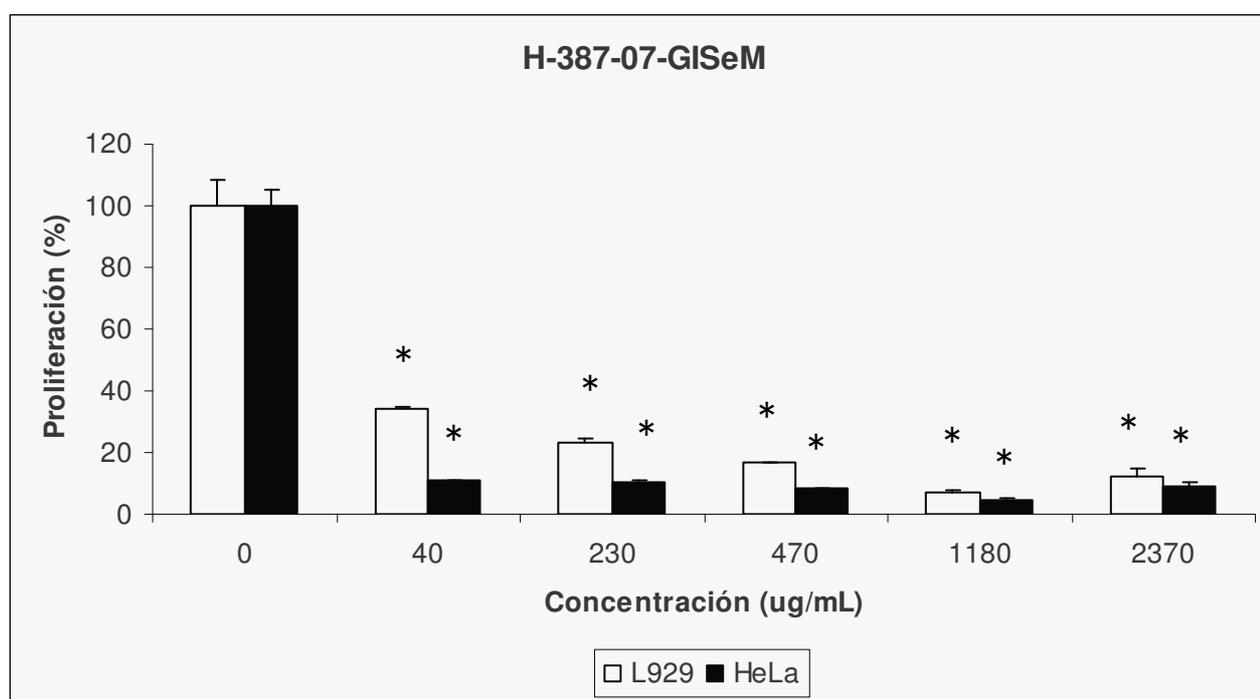


Figura 4. Curva dosis respuesta del efecto del extracto H-387-07-GISeM sobre la proliferación celular de las líneas tumorales L929 y HeLa. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Debido a que todas las dosis frenan la proliferación fue necesario reducir las concentraciones para encontrar una curva dosis respuesta. Considerando que las dosis de 40 y 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ parecen evidenciar un efecto inhibitorio menos severo, ambas concentraciones fueron empleadas en el siguiente experimento. Con el uso de 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con la cual se encontró que la dosis mínima permitió alcanzar un 50 % de la proliferación con respecto al control (0) para L929, mientras que para HeLa, el efecto inhibitorio se aproximó al 90 % (Figura 5).

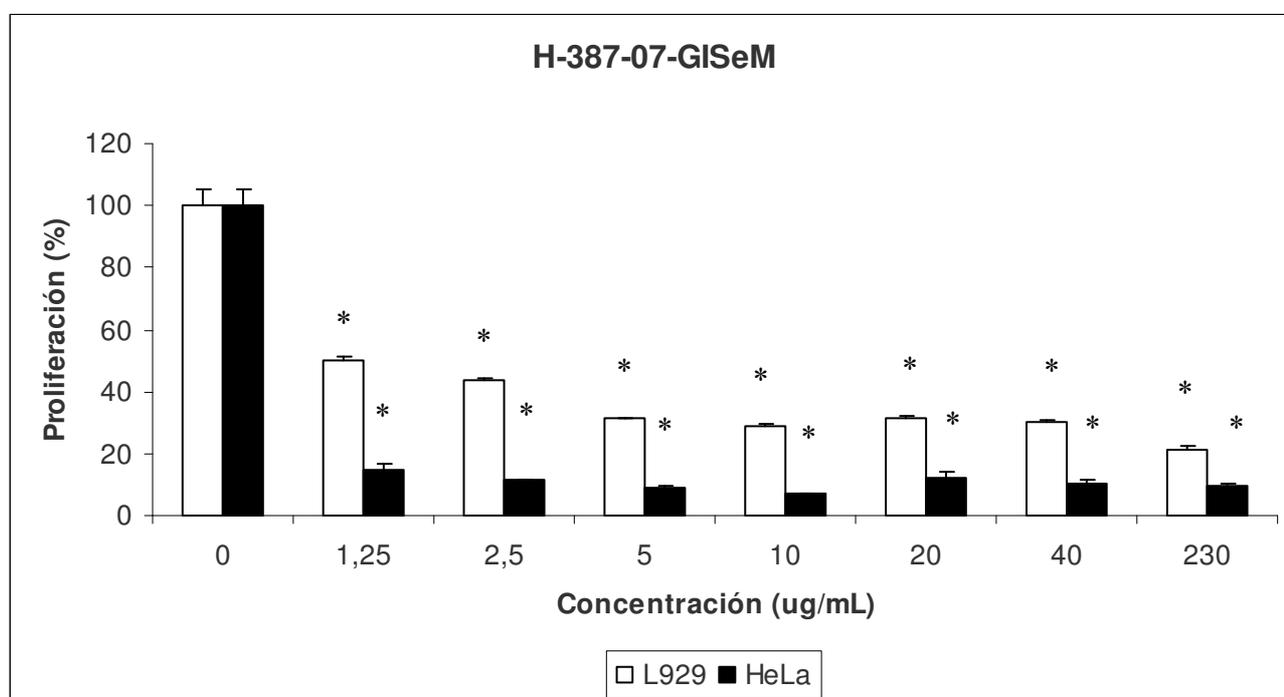


Figura 5. Curva dosis respuesta del efecto del extracto H-387-07-GISem sobre la proliferación celular de las líneas tumorales L929 y HeLa, con las concentraciones modificadas. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Una nueva dilución empleando dosis de 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ permitió observar una curva dosis respuesta completa tanto para L929 como para HeLa (Figura 6). Con esta información se repitió el ensayo adicionando un experimento con células fibroblásticas de pulmón de ratón normal, la cual también afectó la proliferación en forma dosis dependiente y en todos los casos la actividad inhibitoria alcanzó niveles similares al de 5 μM de citarabina (Ara-C), un reconocido agente antitumoral que se utilizó como un control positivo de proliferación celular (Figura 6).

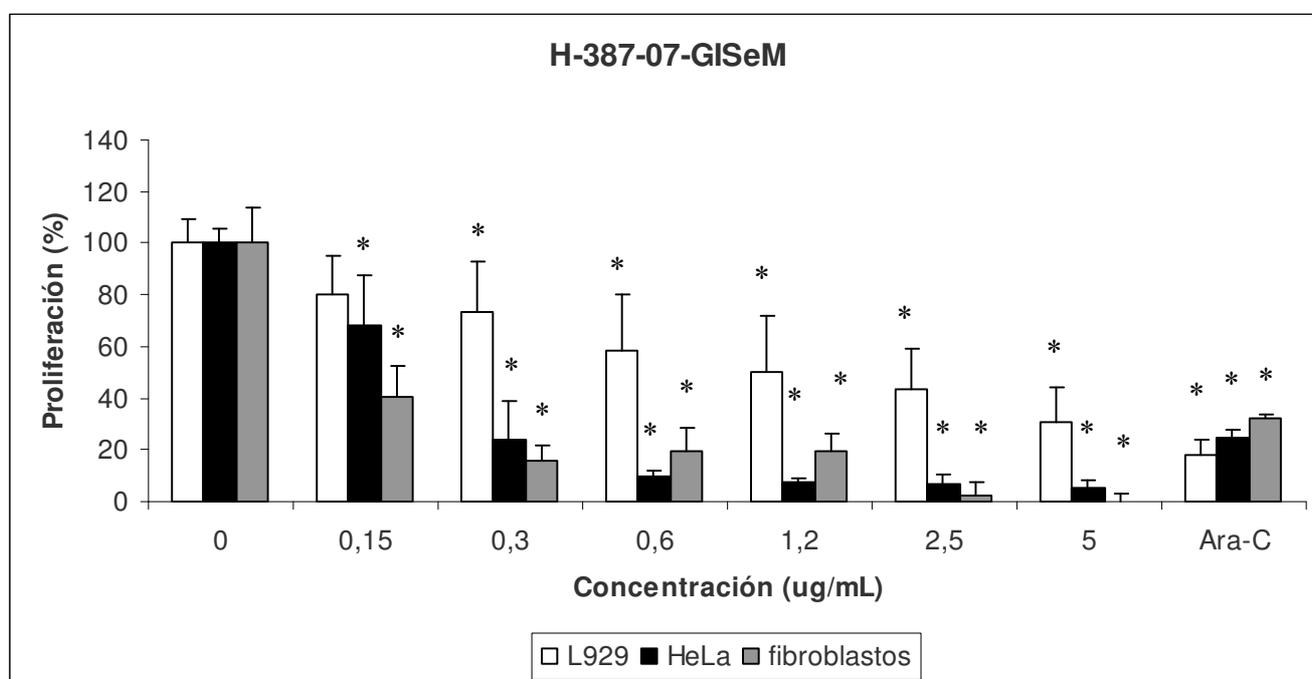


Figura 6. Curva dosis respuesta del efecto del extracto H-387-07-GISeM sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Siguiendo la misma estrategia de dilución y ensayo biológico que se utilizó para el extracto H-387-07-GISeM, se encontraron las dosis de 0, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del chayote *S. compositum*, en estado seco, donde se obtuvo la curva dosis respuesta de inhibición de la proliferación celular para los tres tipos de células, aun cuando HeLa y fibroblastos normales son más sensibles al efecto inhibitorio del extracto a partir de la concentración de 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 7).

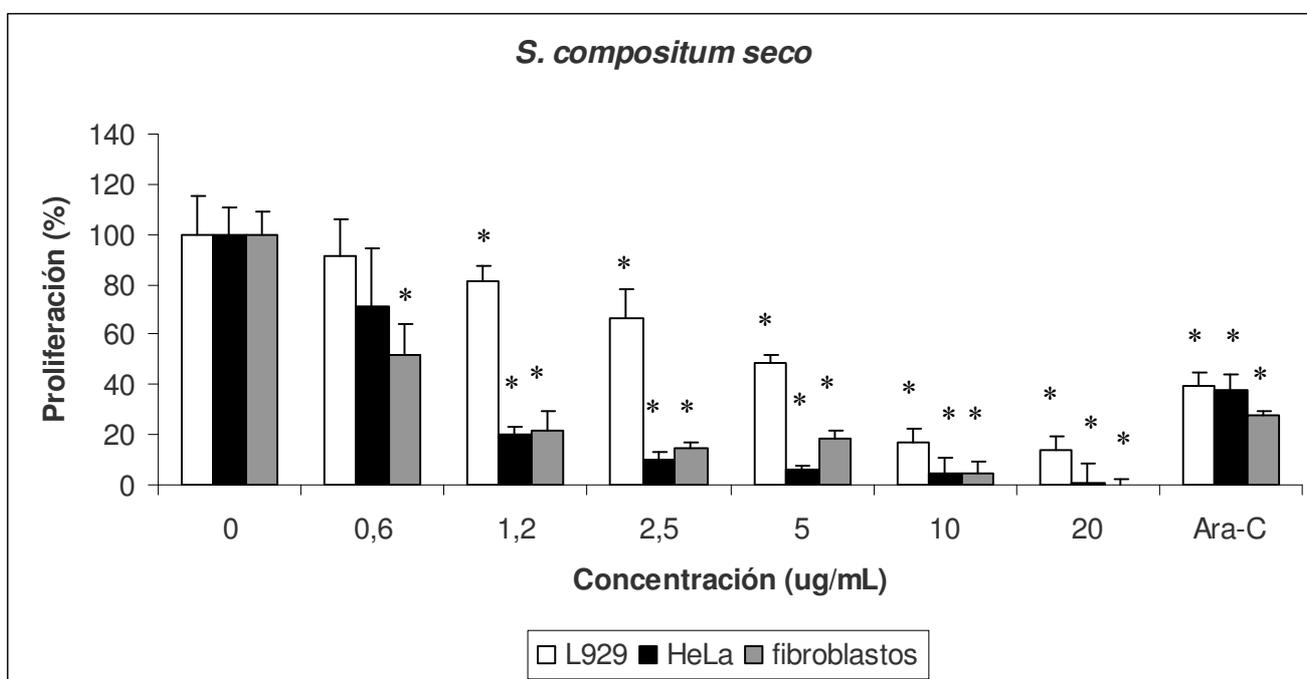


Figura 7. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. compositum* en estado seco sobre la proliferación celular de las líneas tumorales L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Con la finalidad de evaluar si el extracto del fruto de *S. compositum* en estado fresco también ejerce un efecto inhibitorio, se emplearon las mismas dosis de 0, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). Los datos indican que solo en las dosis mayores a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ es posible observar un efecto inhibitorio contundente sobre la línea HeLa y fibroblastos normales.

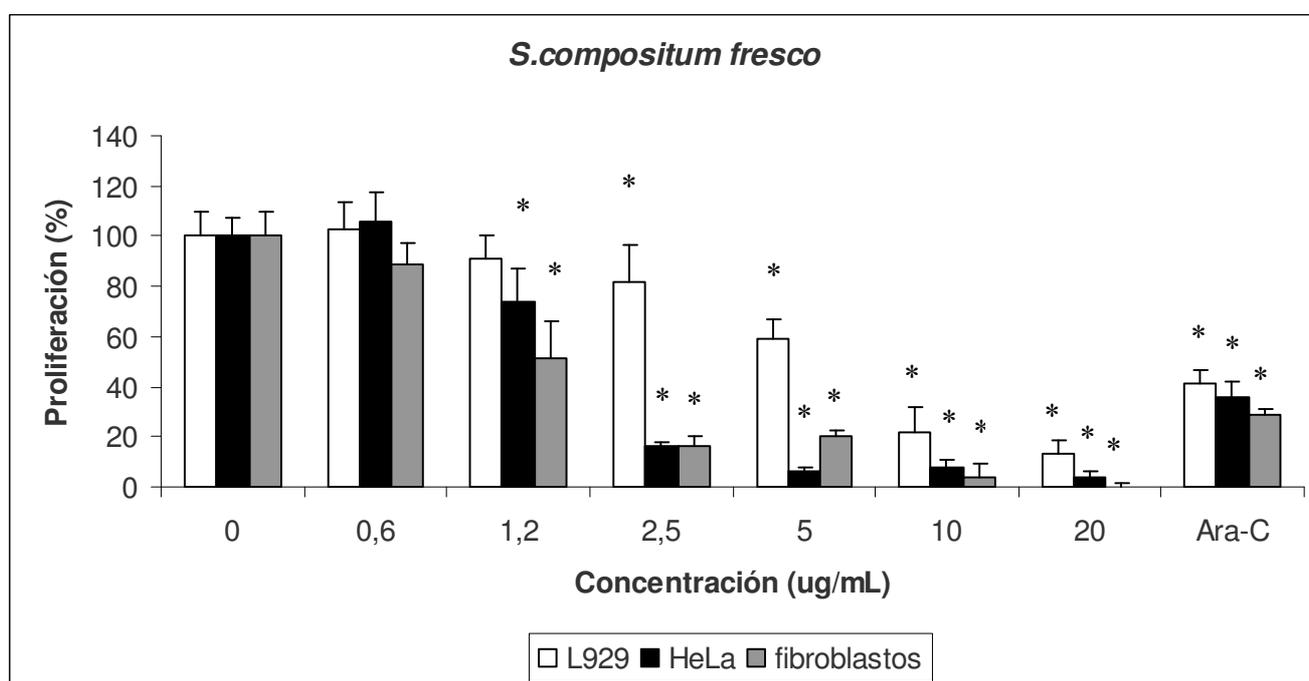


Figura 8. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. compositum* en estado fresco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Para el extracto del chayote *S. chinantlense* en estado seco, basados en la estrategia establecida de dilución y ensayo biológico, se utilizaron las dosis de 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ donde se obtuvo una curva dosis respuesta de inhibición de la proliferación celular para los tres tipos de células, aunque de igual forma que en *S. compositum* en estado seco, HeLa y fibroblastos normales son más sensibles al efecto inhibitorio del extracto a partir de la concentración de 1.2 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9).

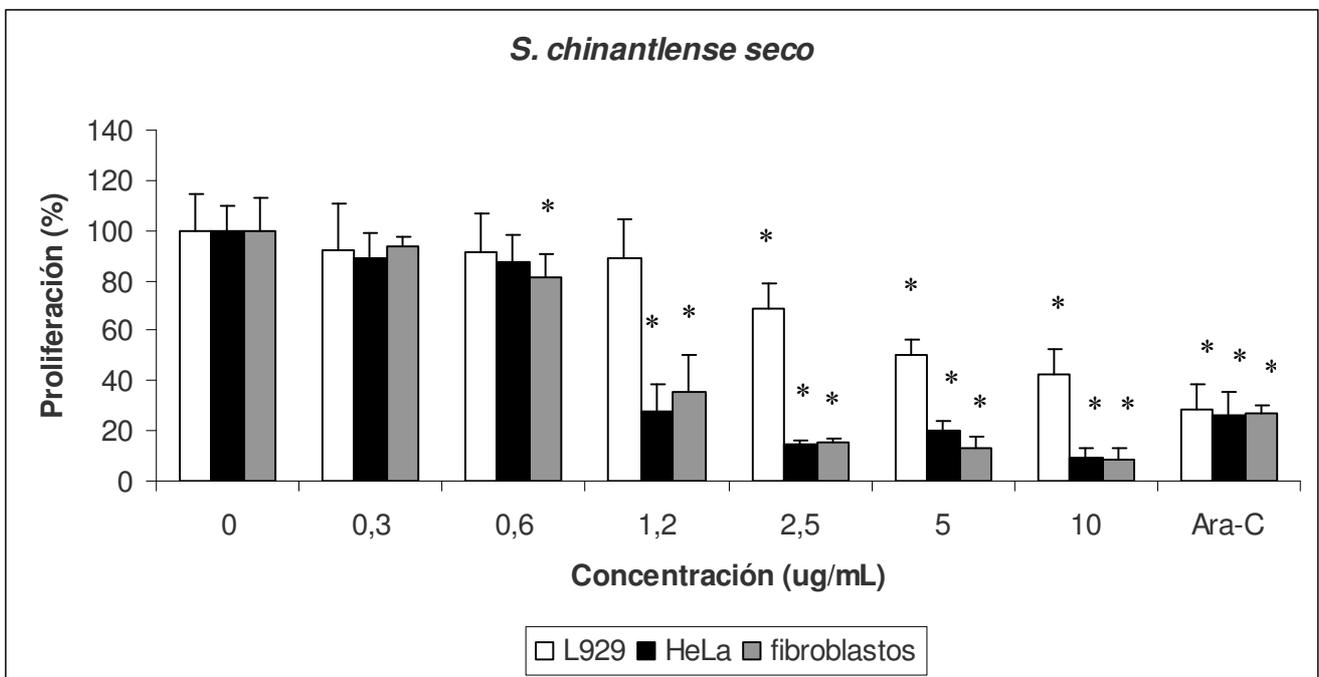


Figura 9. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* en estado seco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Del mismo modo, para evaluar si el extracto del fruto de *S. chinantlense* en estado fresco muestra un efecto inhibitorio, se utilizaron las mismas dosis de 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, y 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Los datos indican que en la dosis de 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ya se observa un efecto inhibitorio contundente en la línea HeLa y fibroblastos normales, y alcanzan la máxima inhibición a la dosis de 1.2 $\mu\text{g/mL}$.

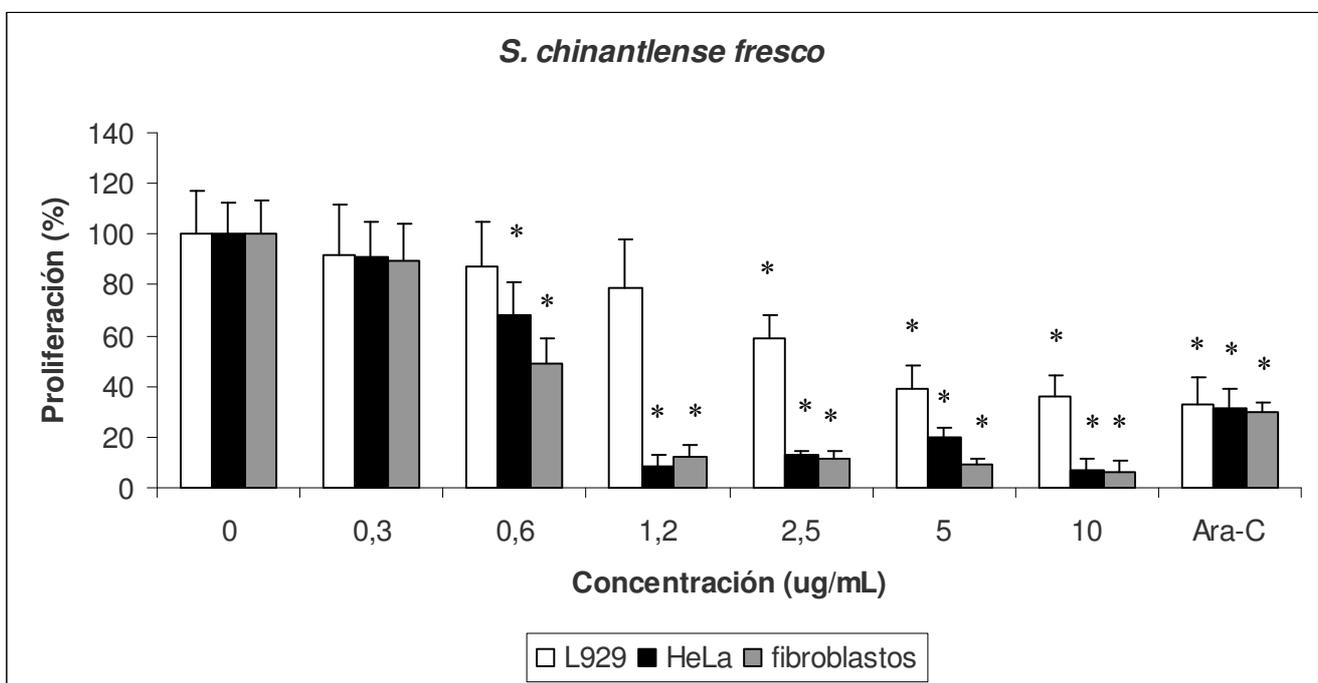


Figura 10. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* en estado fresco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Los chayotes utilizados para los extractos anteriores contaban con la característica de tener espinas en la epidermis. Debido a que existe una variante sin espinas (s/e) de *S. chinantlense* de la cual se utilizó el extracto seco, empleando dosis de 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se encontró que las tres líneas fueron sensibles al extracto, aunque HeLa y fibroblastos normales son más sensibles al efecto inhibitorio a partir de la concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 11).

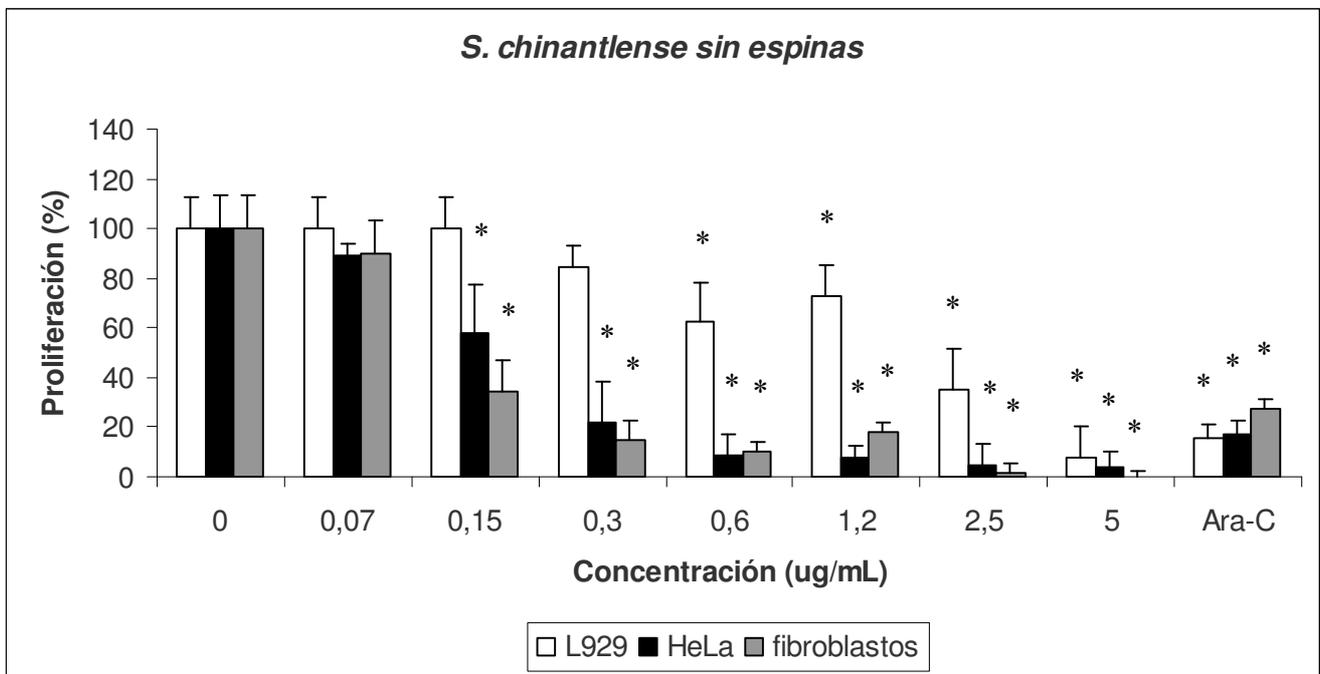


Figura 11. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* sin espinas sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Evaluación del efecto de los extractos sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929 con la técnica de sulforodamina-B (SRB).

Con la finalidad de corroborar la reducción en la proliferación inducida por los extractos, se repitieron los experimentos en las mismas condiciones de cultivo y dosis, empleando la técnica de Sulforodamina-B, la cual es ampliamente usada para evaluar el efecto antiproliferativo de diferentes moléculas con propiedades antitumorales. Los resultados indicaron que el extracto de H-387-07-GISeM tiene un fuerte efecto antiproliferativo sobre HeLa desde 0.3 $\mu\text{g/mL}$, en fibroblastos normales desde 0.6 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en L929 es gradual hasta la concentración máxima (Figura 12).

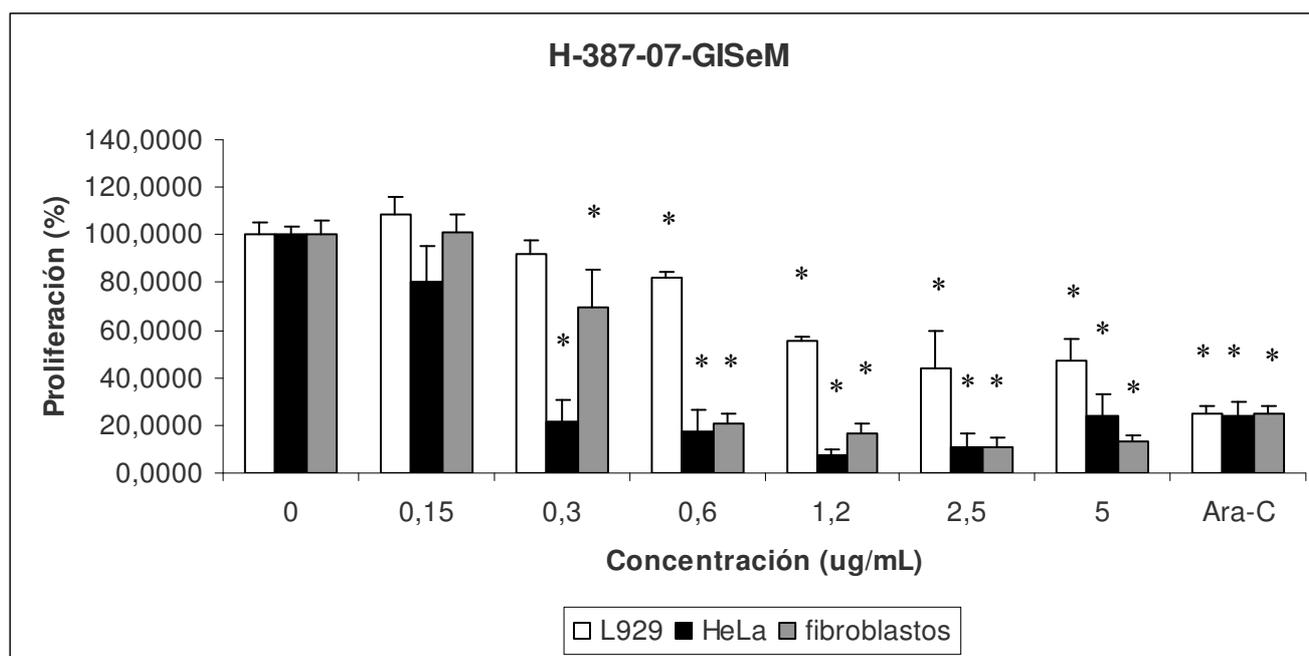


Figura 12. Curva dosis respuesta del efecto del extracto H-387-07-GISeM sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el caso del extracto de *S. compositum* en estado seco, la disminución de la proliferación fue acentuada para HeLa en la dosis 0.6 µg/mL, con los fibroblastos normales en 1.2 µg/mL y en L929 de forma gradual en toda la curva a partir de 1.2 µg/mL (Figura 13).

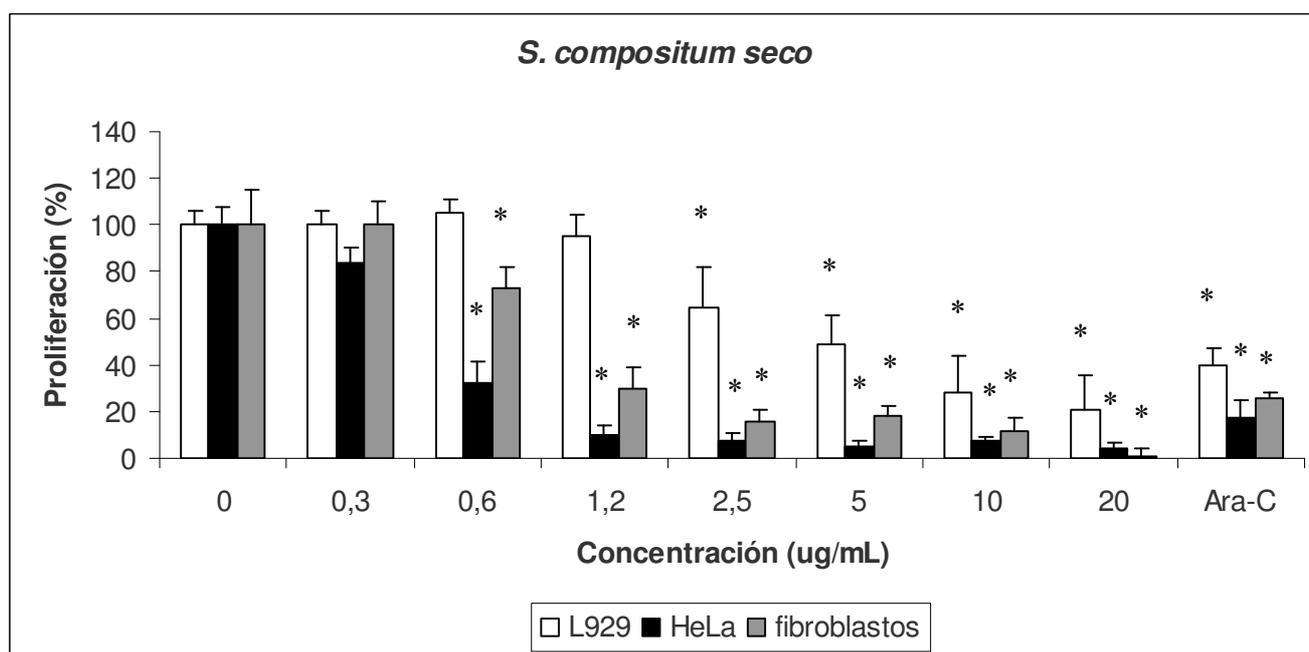


Figura 13. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. compositum* en estado seco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el caso comparativo del extracto de *S. compositum* en estado fresco, se observó que para HeLa la proliferación disminuye en la concentración de 1.2 µg/mL, de igual forma para fibroblastos desde 2.5 µg/mL, mientras que para L929 la reducción fue gradual a partir de 2.5 µg/mL (Figura 14).

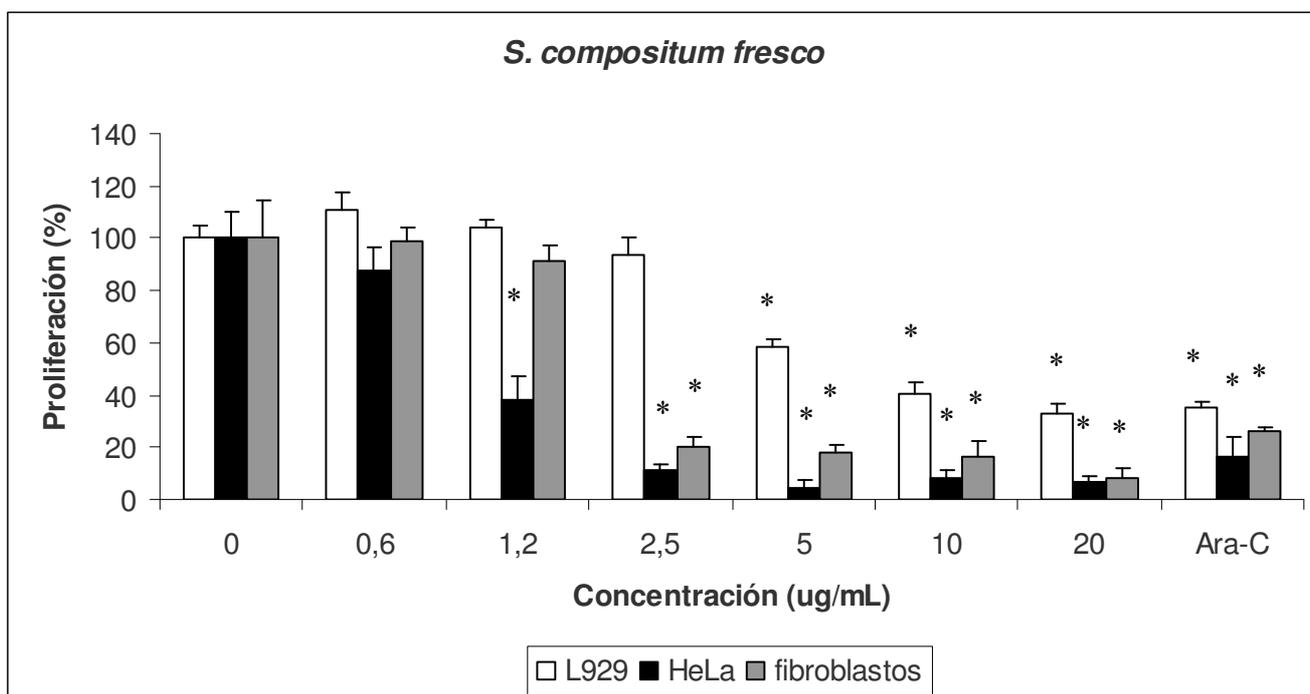


Figura 14. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. compositum* en estado fresco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Para el extracto del chayote *S. chinantlense* en estado seco, se observa que a la concentración de 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la disminución de la proliferación es marcado en HeLa y para fibroblastos es moderado, mientras que para L929 es mínimo y reduce gradualmente a medida que se aumenta la concentración del extracto (Figura 15).

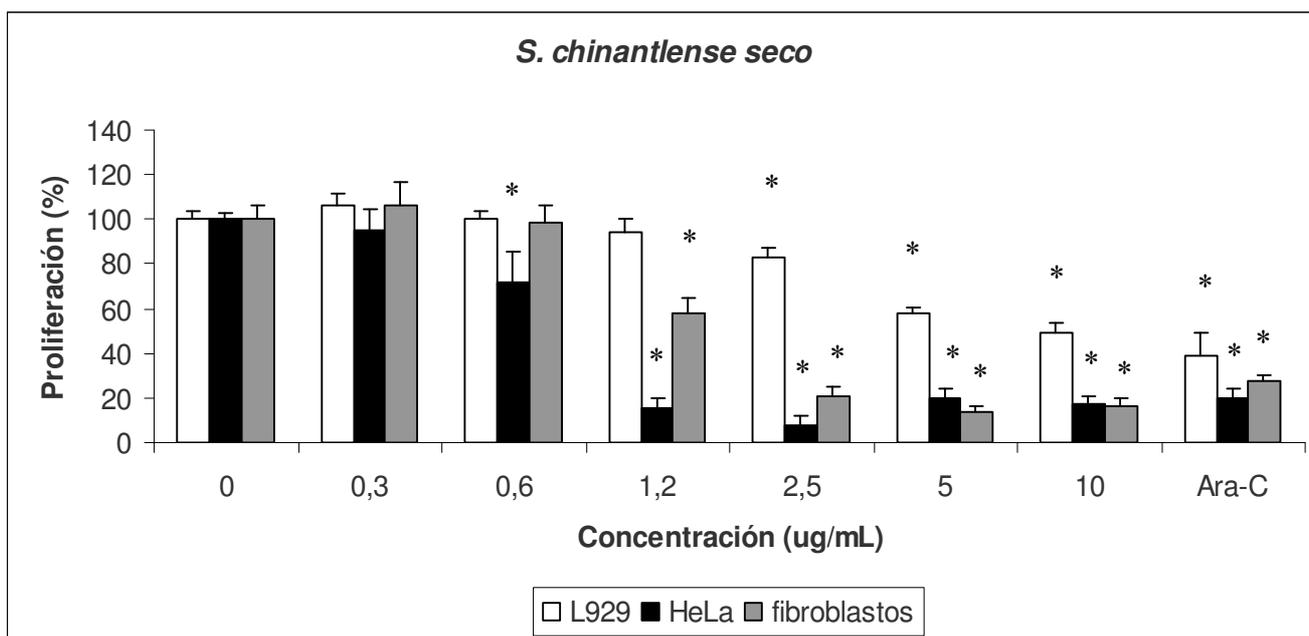


Figura 15. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* en estado seco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

El extracto del fruto de *S. chinantlense* en estado fresco muestra un efecto antiproliferativo moderado para HeLa en la concentración de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es muy marcado para los fibroblastos, en tanto que L929 comienza gradualmente a partir de esta última concentración (Figura 16)

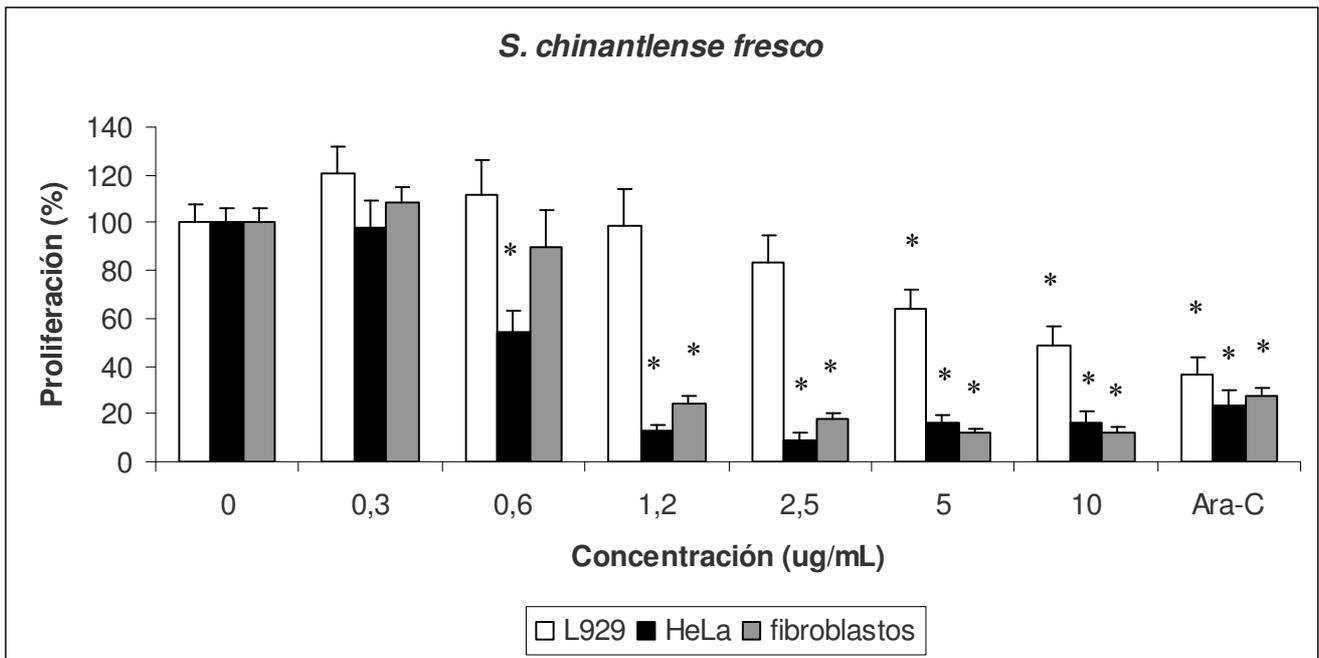


Figura 16.- Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* en estado fresco sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el caso del extracto de *S. chinantlense* sin espinas, la reducción de la proliferación es muy marcada para HeLa y fibroblastos en la concentración de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ y a partir de esta se presenta la disminución gradual en L929 (Figura 17).

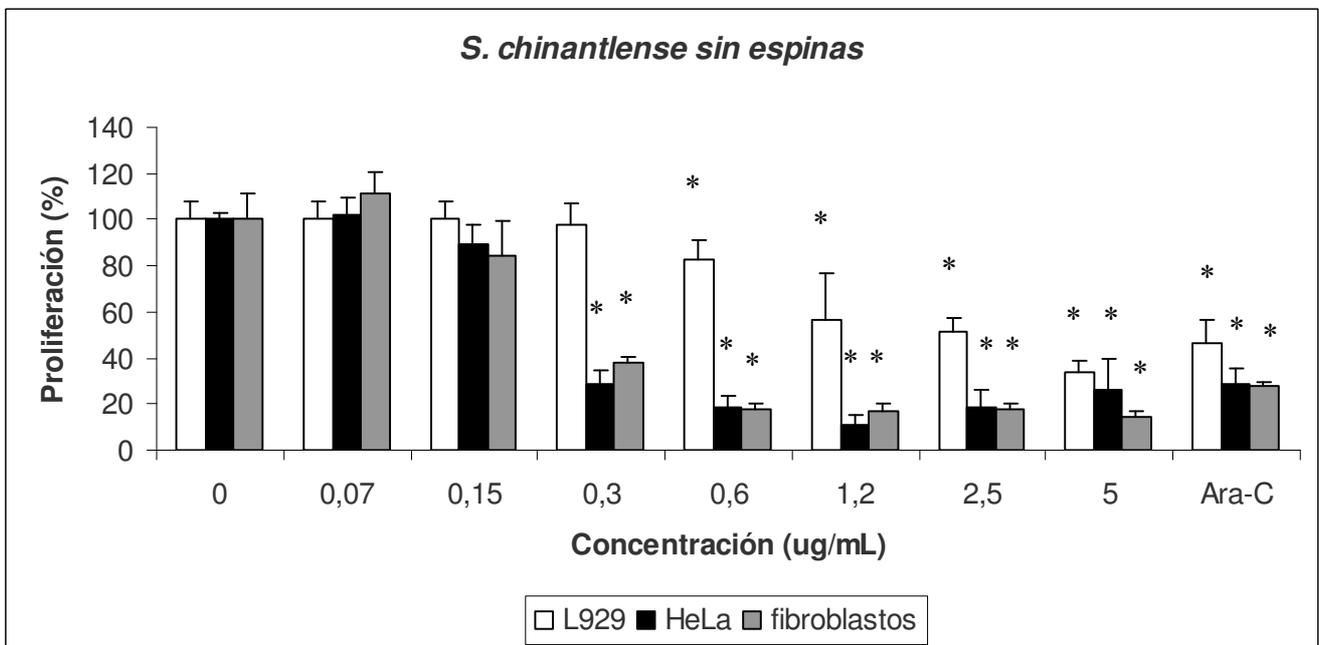


Figura 17. Curva dosis respuesta del efecto del extracto *S. chinantlense* sin espinas sobre la proliferación celular de las líneas L929, HeLa y fibroblastos normales. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. Las líneas sobre las barras indican \pm la desviación estándar. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

Determinación de la concentración de inhibición media (IC₅₀) de los extractos para la línea celular HeLa y L929.

Con los datos de proliferación obtenidos en los bioensayos, se determinaron las concentraciones de inhibición media (IC₅₀) teóricas de la proliferación de cada técnica empleada (cristal violeta y Sulforodamina-B). Los datos mostrados corresponden a los extractos evaluados con cada línea celular (Tabla 1).

Extracto	Cristal violeta			Sulforodamina-B		
	HeLa	L929	Fibroblastos	HeLa	L929	Fibroblastos
<i>S. compositum</i> fresco	1.73	6.37	1.33	1.10	8.03	1.90
<i>S. compositum</i> seco	0.8	4.57	0.73	0.49	4.61	0.93
<i>S. chinantlense</i> fresco	0.73	3.78	0.64	0.73	8.72	0.97
<i>S. chinantlense</i> seco	0.95	4.87	1.02	0.8	8.66	1.66
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	0.19	1.85	0.12	0.25	3.17	0.27
H-387-07-GISeM	0.2	1.72	0.13	0.22	1.98	0.42

Tabla 1. Concentraciones (µg/mL) teóricas de inhibición media (IC₅₀) de seis tipos de extractos vegetales, sobre la proliferación celular de las líneas tumorales HeLa, L929 y Fibroblastos normales, mediante las técnicas cristal violeta y Sulforodamina-B.

Para confirmar que las concentraciones teóricas anteriores presentan dicho efecto antiproliferativo al 50 %, se sometieron a experimentación, repitiendo las condiciones de cultivo de 72 horas en placas de 96 pozos y estimulando a las células con la dosis teórica de IC₅₀. Para ajustar la concentración se incluyeron una dosis menor y una mayor según cada extracto; para así obtener el efecto biológico buscado. Lo anterior generó los nuevos valores de IC₅₀ experimentales y fueron evaluadas por la técnica de cristal violeta (Tabla 2).

Extracto	IC ₅₀ (µg/mL) Experimental		
	HeLa	L929	Fibroblastos
<i>S. compositum</i> fresco	1.51	6.37	1.33
<i>S. compositum</i> seco	0.81	4.57	0.73
<i>S. chinantlense</i> fresco	0.74	3.33	0.64
<i>S. chinantlense</i> seco	0.93	4.87	1.02
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	0.26	1.85	0.12
H-387-07-GISeM	0.2	2.84	0.28

Tabla 2. Concentraciones experimentales de inhibición media (IC₅₀) de seis tipos de extractos vegetales, sobre la proliferación celular de las líneas tumorales HeLa, L929 y Fibroblastos, mediante la técnica cristal violeta.

Evaluación del efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular HeLa y L929.

Con la finalidad de confirmar que el efecto de los extractos sobre la reducción de la proliferación de las líneas celulares no era debido a un efecto citostático, se realizaron experimentos con cada extracto para las tres líneas celulares; utilizando las concentraciones de IC₅₀ experimental y se evaluó el número de células vivas y muertas por exclusión de azul tripano.

En el caso de la línea celular HeLa se observa que con las concentraciones de IC₅₀ de todos los extractos excepto H-387-07-GISeM, el número celular está por debajo del número inicial de siembra, el cual es de 4×10^3 , con una viabilidad alrededor del 50 %. Al utilizar el doble de la concentración de IC₅₀ incluyendo el H-387-07-GISeM, el número celular se reduce a la mitad del número inicial de siembra y con menos del 50 % de viabilidad. Con todos los extractos, al utilizar la mitad de la concentración de IC₅₀, el número total de células está por encima del número inicial de siembra, incluso *S. compositum* es estado seco y *S. chinantlense* en estado fresco alcanzan un número celular cercano al control, con una viabilidad de más del 70 % pero menos del 85 % excepto *S. compositum* es estado seco que es del 90 % aproximándose a la viabilidad del control que es de más del 92 % (Figura 18).

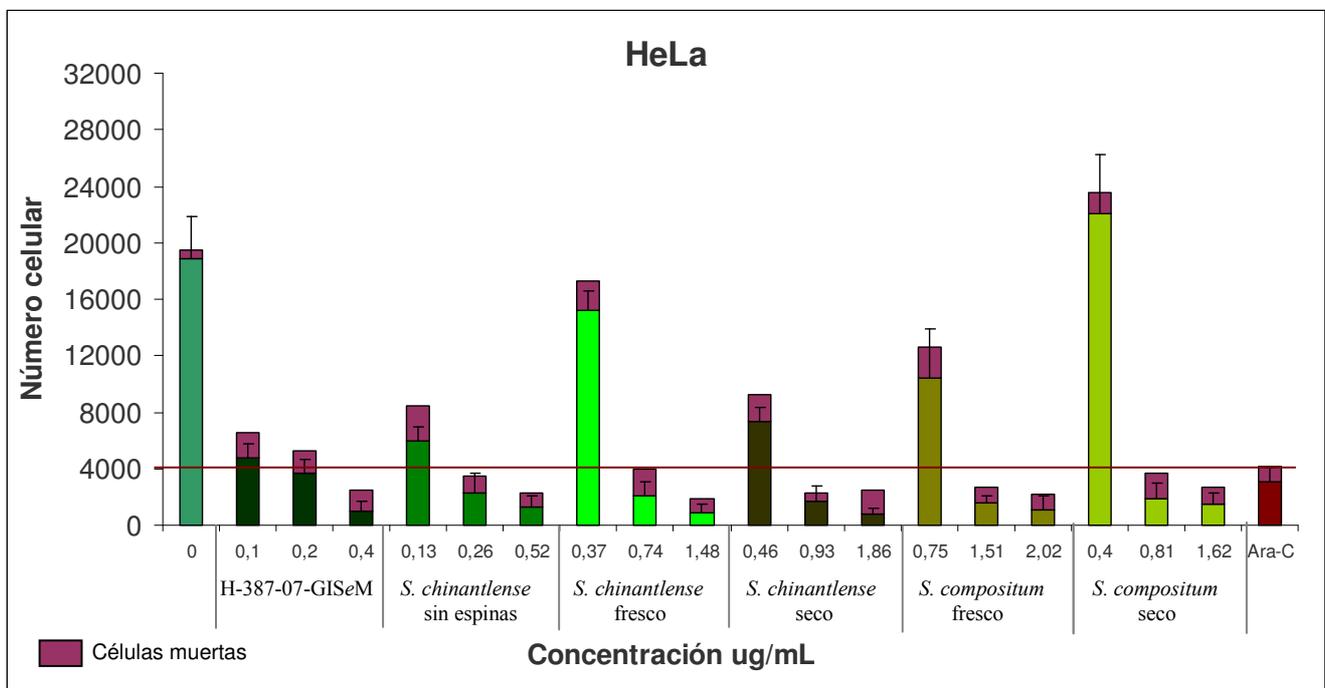


Figura 18. Evaluación de la viabilidad por conteo celular por exclusión de azul tripano del efecto de diferentes concentraciones de los seis extractos sobre la línea celular HeLa.

Para la línea celular L929 se observa que con las concentraciones de IC₅₀ de todos los extractos, excepto *S. compositum* en estado fresco, el número celular obtenido está por debajo del número inicial de siembra, (4×10^3), con una viabilidad alrededor del 50 %. Al utilizar el doble de la concentración de IC₅₀, el número celular se reduce casi a la mitad del número inicial de siembra y con menos del 50 % de viabilidad, excepto *S. compositum* en estado seco y *S. compositum* en estado fresco, en ambos el número celular apenas se reduce por abajo del número inicial de siembra, pero el primero con menos del 50 % y el segundo con 80 % de viabilidad. De igual forma al utilizar la mitad de la concentración de IC₅₀, el número total de células obtenido está por debajo del número celular inicial de siembra, para los extractos H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* sin espinas y *S. compositum* en estado seco con una viabilidad del 50 % al 70 %. Los extractos *S. chinantlense* en estado fresco, *S. chinantlense* en estado seco y *S. compositum* en estado fresco tienen un ligero aumento sobre el número celular inicial de siembra con viabilidad del 70 % al 80 %. El control presenta una viabilidad del 90 % (Figura 19).

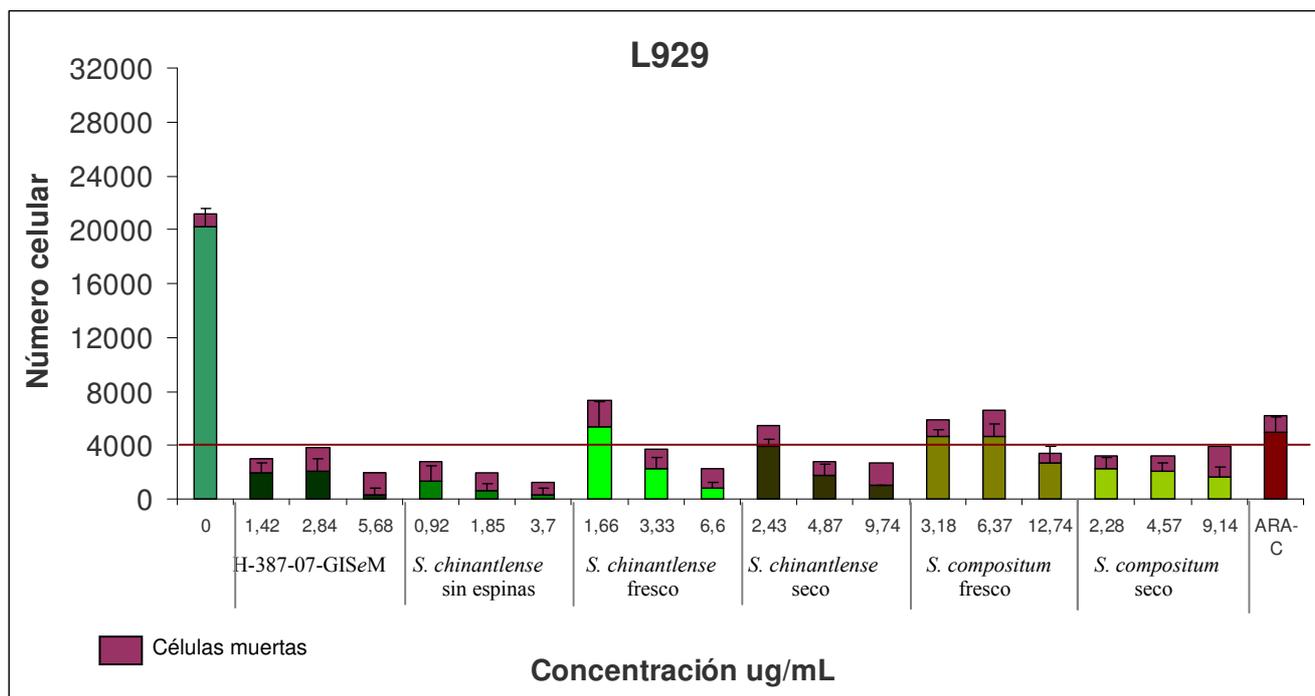


Figura 19. Evaluación de la viabilidad por conteo celular por exclusión de azul tripano del efecto de diferentes concentraciones de los seis extractos sobre la línea celular L929.

En los fibroblastos normales se observa que con las concentraciones de IC₅₀ de todos los extractos excepto el H-387-07-GISeM y *S. compositum* es estado fresco, el número celular obtenido está por debajo del número inicial de siembra, con una viabilidad alrededor del 65 %. Al utilizar el doble de la concentración de IC₅₀ excepto el H-387-07-GISeM, el número celular se reduce a la mitad del número inicial de siembra y con el 50 % de viabilidad o menos. Con todos los extractos, al utilizar la mitad de la concentración de IC₅₀, el número total de células está por encima del número inicial de siembra (4x10³), incluso *S. chinantlense* sin espinas alcanza un número celular cercano al control, con una viabilidad del 80 % aproximándose a la viabilidad del control que es de más del 94 %. Los demás extractos con número celular aproximado al número inicial de siembra y con una viabilidad del 90 %, puntualizando que *S. chinantlense* es estado seco y *S. compositum* es estado seco reducen el número celular significativamente en todas sus concentraciones (Figura 20).

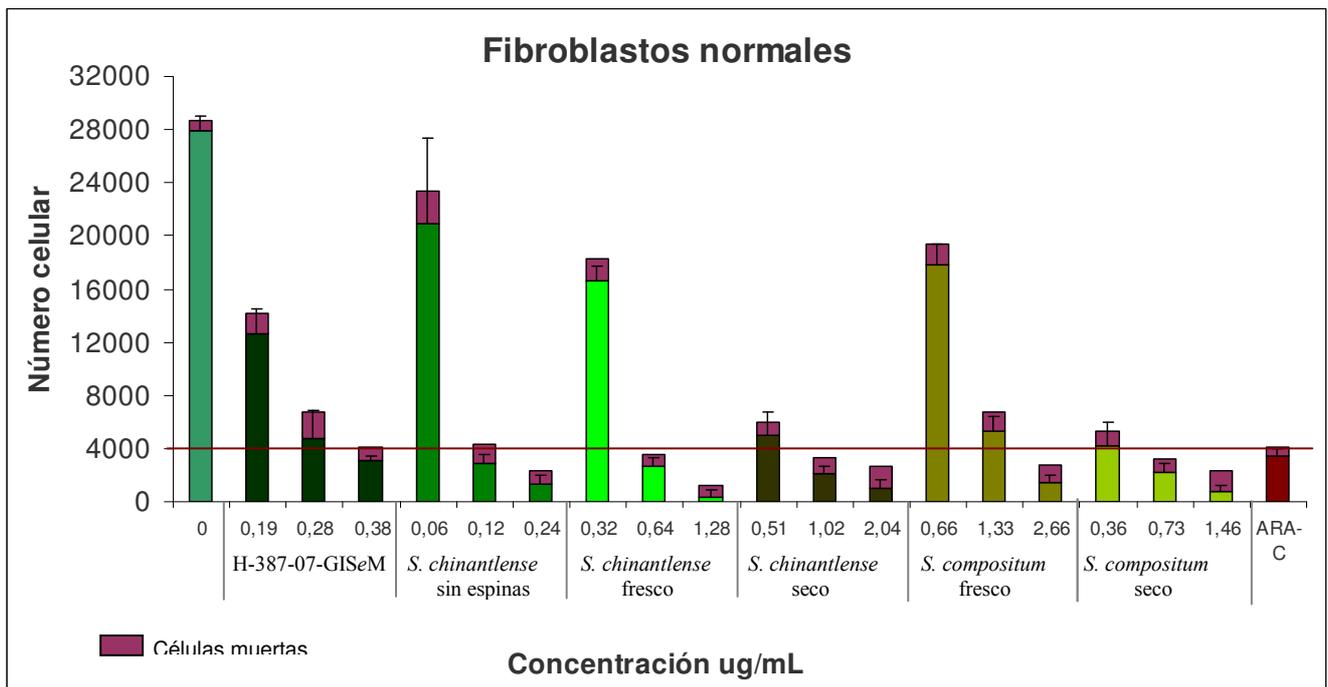


Figura 20. Evaluación de la viabilidad por conteo celular por exclusión de azul tripano del efecto de diferentes concentraciones de los seis extractos sobre fibroblastos normales.

Evaluación del efecto de los extractos sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular HeLa y L929.

Al observar que el número celular y viabilidad de cada línea se reduce con la concentración de la IC_{50} experimental de cada extracto, lo cual fue indicativo de que se induce muerte celular, se procedió a evaluar si dicha reducción se debe a una inducción a la apoptosis. Cada línea celular se cultivó con la dosis de IC_{50} experimental de cada extracto por 48 horas y se realizó una tinción con Giemsa y se procedió a la detección de cuerpos apoptóticos. Al observar bajo el microscopio se muestra claramente la diferencia morfológica de las células estimuladas con todos los extractos en comparación a sus respectivos controles; las células presentan daño celular, como alteración en la membrana, en el citoplasma y en el núcleo, así como la formación de cuerpos apoptóticos (Figura 21, 22 y 23).

HeLa

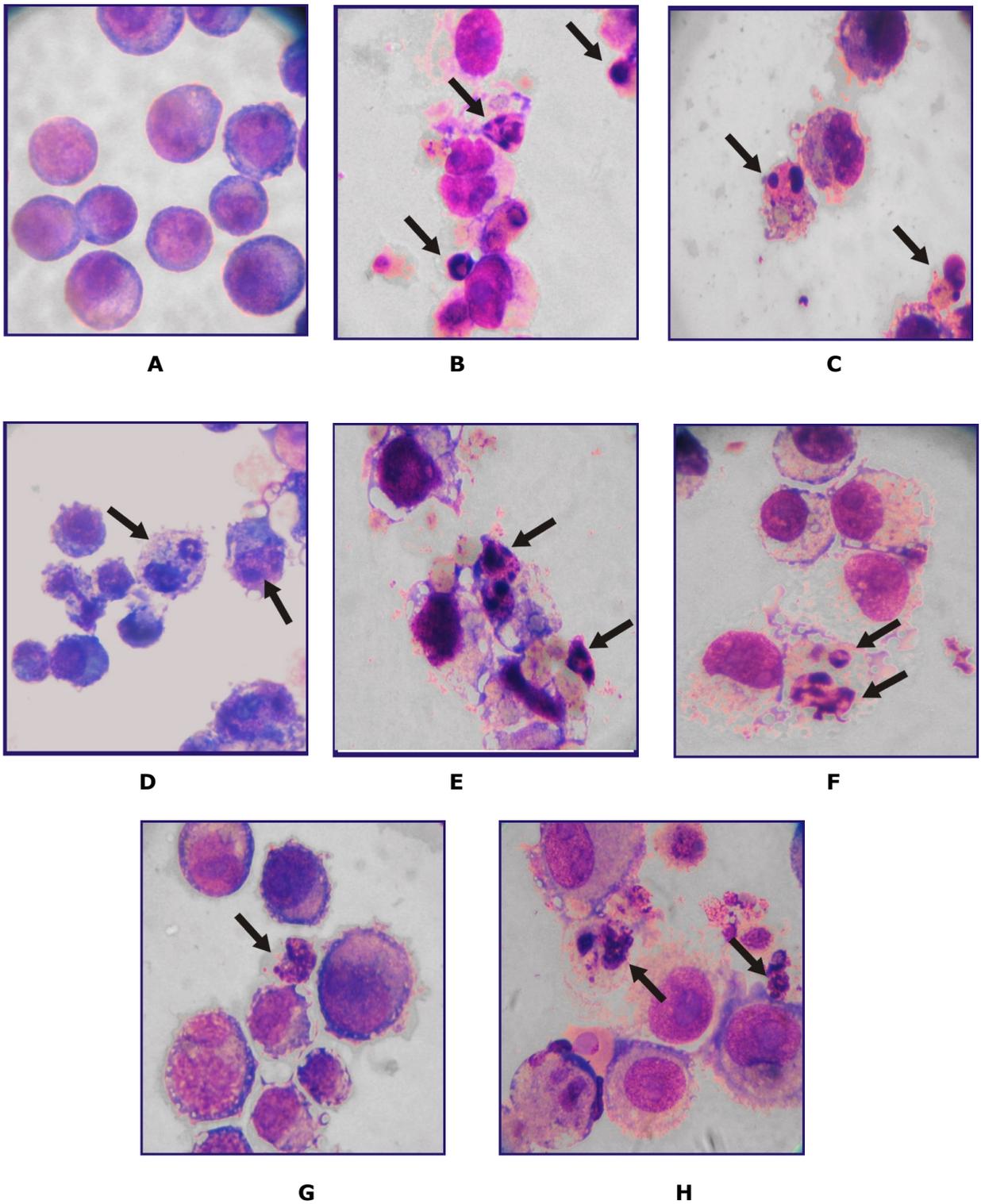


Figura 21. Las flechas señalan los cuerpos apoptóticos de células de la línea celular HeLa (100x), después de 48 horas de estímulo con la IC₅₀ de seis extractos vegetales: A- Control, B- *S. compositum* seco, C- *S. compositum* fresco, D- *S. chinantlense* seco, E- *S. chinantlense* fresco, F- *S. chinantlense* sin espinas, G- H-387-07-GISeM, H- Ara-C, mediante tinción de Giemsa.

L929

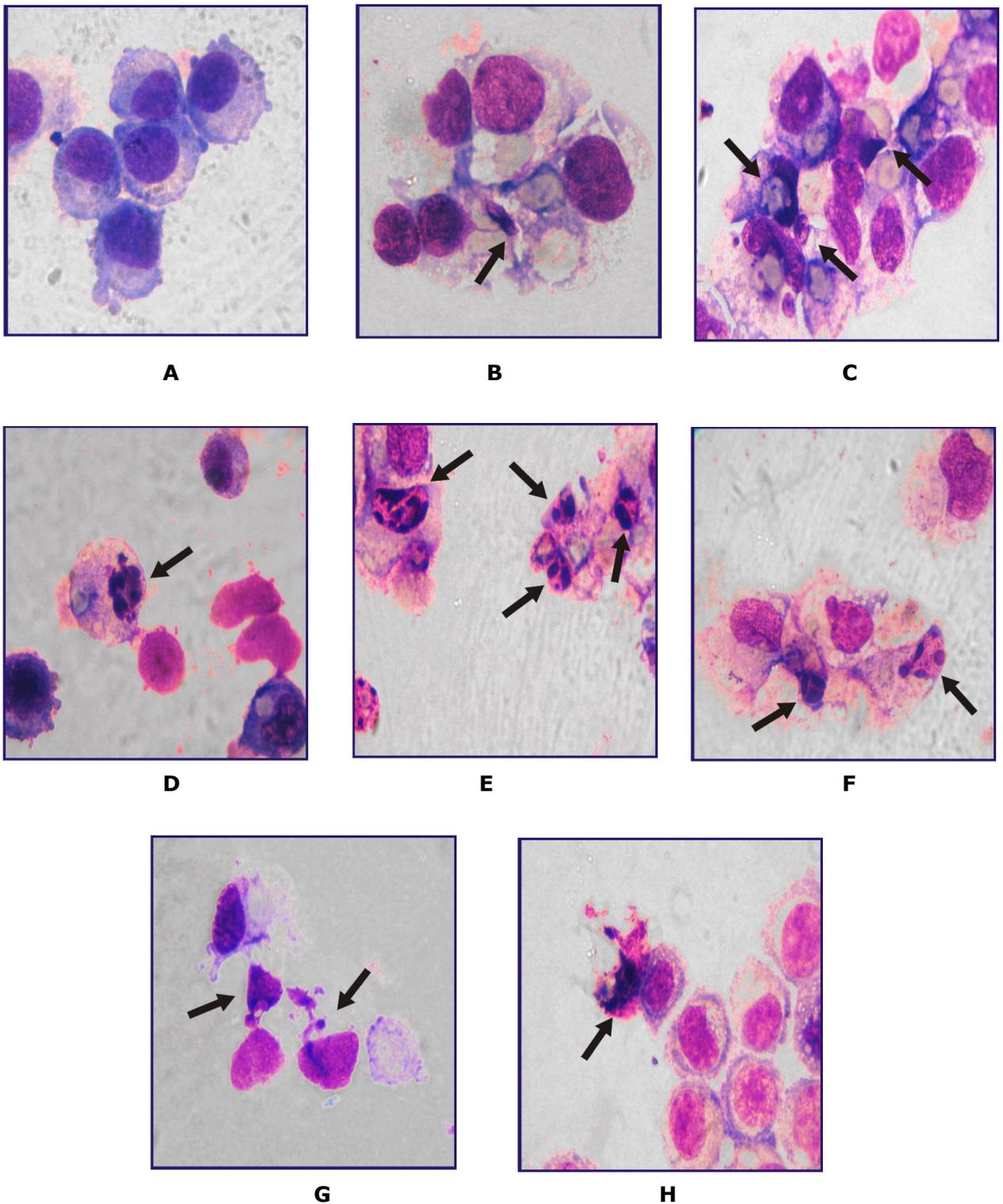


Figura 22. Las flechas señalan los cuerpos apoptóticos de células de la línea celular L929 (100x), después de 48 horas de estímulo con la IC_{50} de seis extractos vegetales: A- Control, B- *S. compositum* seco, C- *S. compositum* fresco, D- *S. chinantlense* seco, E- *S. chinantlense* fresco, F- *S. chinantlense* sin espinas, G- H-387-07-GISeM, H- Ara-C, mediante tinción de Giemsa.

Fibroblastos Normales

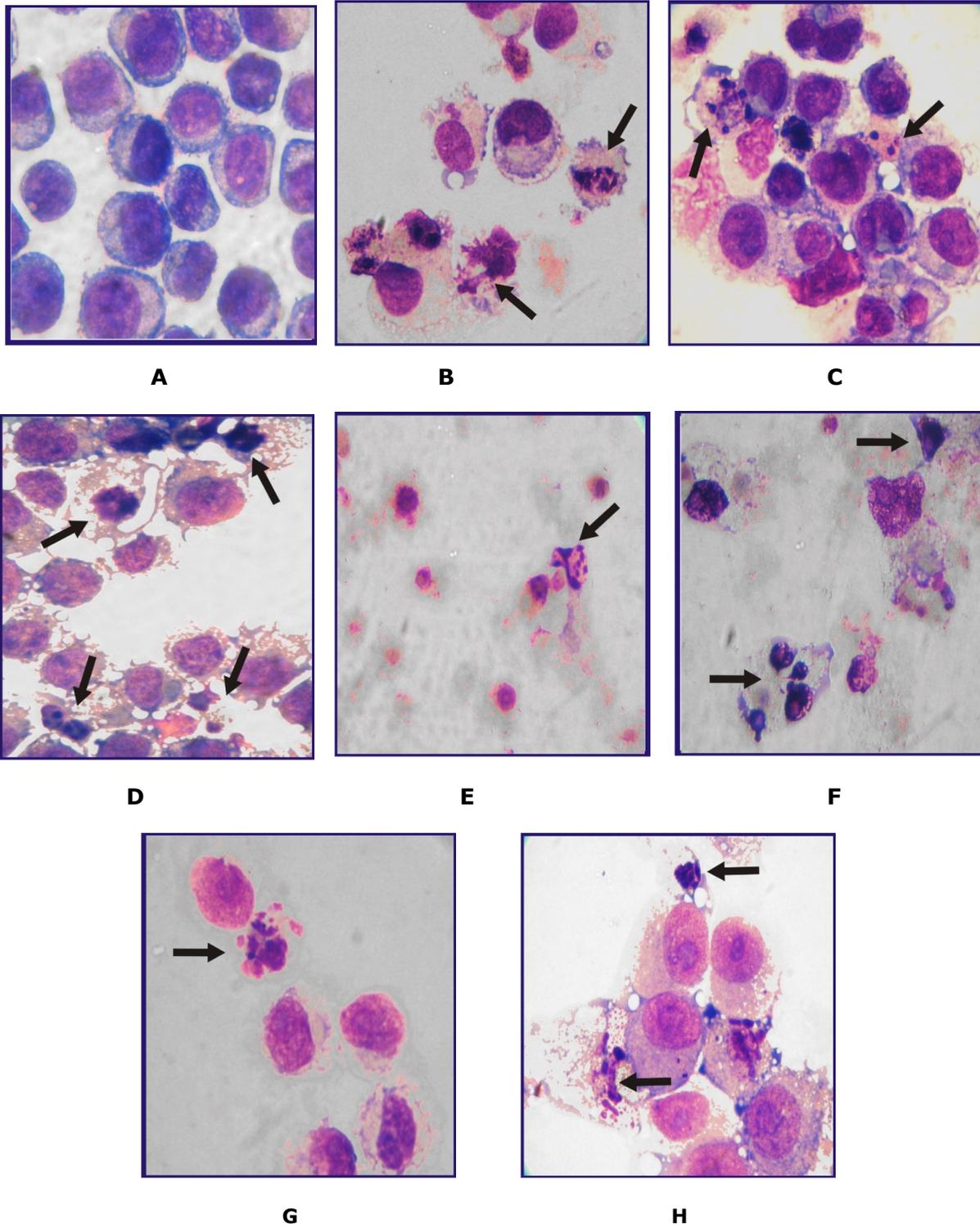


Figura 23. Las flechas señalan los cuerpos apoptóticos de células (100x), de la línea celular fibroblastos normales después de 48 horas de estímulo con la IC_{50} de seis extractos vegetales: A- Control, B- *S. compositum* seco, C- *S. compositum* fresco, D- *S. chinantlense* seco, E- *S. chinantlense* fresco, F- *S. chinantlense* sin espinas, G-H-387-07-GISem, H- Ara-C, mediante tinción de Giemsa.

Al evaluar el porcentaje de cuerpos apoptóticos, los resultados indicaron que en todos las líneas celulares se indujo su formación con el tratamiento de los extractos vegetales, mientras que en los controles no se registró (Tabla 3). El extracto de mayor acción para HeLa fue *S. chinantlense* fresco, mientras que para L929 fue *S. chinantlense* sin espinas y para fibroblastos normales fue *S. compositum* seco.

	Cuerpos apoptóticos (%)		
	HeLa	L929	Fibroblastos normales
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>S. compositum</i> fresco	9.5 ± 4.9	23 ± 8.4	13 ± 2.8
<i>S. compositum</i> seco	25 ± 1.4	11.5 ± 2.1	21.5 ± 6.3
<i>S. chinantlense</i> fresco	33.5 ± 13.4	19 ± 15.5	16 ± 0
<i>S. chinantlense</i> seco	6 ± 2.8	8.5 ± 4.9	10.5 ± 0.7
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	16.5 ± 0.7	26 ± 11.3	21 ± 8.4
H-387-07-GISeM	3 ± 1.4	7 ± 4.2	7.5 ± 2.1
Ara-C	21 ± 0	6 ± 1.4	11 ± 0

Tabla 3. Porcentaje de cuerpos apoptóticos inducidos en las tres líneas celulares después de 48h de estímulo con la IC₅₀ experimental de cada extracto, el control y Ara-C 5 µM.

Discusión

Muchos medicamentos modernos tienen su origen en la medicina tradicional, por lo tanto, a pesar de las ventajas de la síntesis química y molecular, las plantas siguen siendo una importante fuente de nuevos fármacos (Abu-Dahab *et al.*, 2007) y en los últimos años se ha incrementado el interés por encontrar nuevos metabolitos con actividad biológica en los extractos de plantas, incluyendo aquellas con actividad antitumoral. Dentro de dicha búsqueda, los ensayos biológicos con extractos crudos obtenidos de los frutos de ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. inhiben la proliferación de las líneas cancerígenas de ratón P388 (leucemia mieloide) pero solo algunas lo hacen sobre L929 (fibrosarcoma de pulmón) (Salas *et al.*, 2007). Incluso el extracto crudo de *S. edule* (Jacq.) Sw. var. *nigrum spinosum*, empleando una concentración de 0.04 a 2.3 mg/mL se observa una curva dosis-dependiente de inhibición de la proliferación en líneas de células tumorales HeLa y L929 (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009).

En este trabajo se muestra que empleando una concentración de 0.04 a 2.3 mg/mL proveniente de extractos crudos de frutos de *S. chinantlense*, *S. chinantlense* sin espinas, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM, todas inhiben completamente la proliferación celular, por lo que en todos los casos fue necesario reducir la concentración gradualmente hasta un rango de 0.07 a 20 µg/mL para encontrar la curva dosis-dependiente de inhibición de la proliferación. Por lo anterior, es evidente que los extractos de las especies *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISeM tienen mayor potencial antiproliferativo, presentando en promedio una IC₅₀ experimental de 0.74 µg/mL para HeLa y 3.97 µg/mL para L929, en comparación a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. var. *nigrum spinosum* que presentan IC₅₀ de 930 µg/mL para HeLa y 370 µg/mL para L929 (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009), o cualquier variedad de *S. edule* (Salas *et al.*, 2007).

El efecto antiproliferativo es contundente ya que los datos son similares independientemente del uso de las técnicas de cristal violeta o sulforodamina-B (SRB). Aunque un análisis más detallado se observa que con cristal violeta es ligeramente más sensible para L929 y SRB más susceptible para HeLa, así en promedio la diferencia entre ambas técnicas no es mayor a dos veces, mientras que para los fibroblastos normales ambas técnicas presentan una sensibilidad semejante (Tabla 1). Por lo anterior se concluye que cualquiera de las dos técnicas utilizadas son efectivas para realizar evaluaciones de proliferación celular en nuestras condiciones.

Otro dato derivado del presente trabajo, es la evidencia que las líneas celulares tienen diferente sensibilidad a un mismo extracto; HeLa sufre una reducción en la proliferación acentuada en comparación con L929, aunque tal diferencia puede explicarse a que ambas células provienen de distintas especies; humano y ratón respectivamente, incluso por provenir de diferentes tejidos; epiteliales y fibroblastos respectivamente, presenten las diferencias (Miletic *et al.*, 2005), aún así lo interesante es que la actividad biológica de los extractos no se restringe a una sola especie. Por otro lado, el efecto de los extractos incluso es diferencial entre el mismo tipo de célula; fibroblastos normales (más sensible) y la línea tumoral L929 (más resistente), ambas provenientes de ratón, efecto que puede explicarse por la capacidad de las células transformadas para excluir agentes antineoplásicos mediante el mecanismo de resistencia a multidrogas (Pizarro, 2006).

Al comparar los extractos de origen fresco y seco de *S. compositum*, se observó que el extracto proveniente de fruto seco parece tener un efecto mayor sobre la reducción de la proliferación, sin embargo la diferencia no es mayor a dos veces en base a la IC_{50} calculada y experimental para cada extracto.

En el caso de *S. chinantlense* fresco y seco, el extracto proveniente de fruto fresco parece tener un efecto mayor al reducir la proliferación de las tres líneas, sin embargo, la diferencia entre dichas concentraciones tampoco fue mayor a dos veces, por lo cual podría considerarse que ambos extractos presentan el mismo efecto. Ampliando la comparación con el híbrido H-387-07-GISeM y el *S. chinantlense* sin espinas, provenientes de extractos secos, el efecto antiproliferativo se da con una IC_{50} menor en comparación a *S. chinantlense* y *S. compositum* fresco y seco respectivamente, lo cual

sugiere que las moléculas causantes del efecto antiproliferativo estén aumentados en el híbrido H-387-07-GISeM y el *S. chinantlense* sin espinas. Un análisis del contenido de metabolitos puede ayudar a corroborar lo anterior.

La actividad antiproliferativa puede ser explicada por inducción de muerte celular. El empleo de la IC_{50} experimental de cada extracto, reveló que la viabilidad celular se reduce en menos del 50% en todos los extractos sobre HeLa e incluso es más acentuado en L929, mientras que en fibroblastos normales la viabilidad se mantiene alrededor del 65%; en la mayoría de los casos en HeLa y L929, las células ya no proliferan e incluso disminuye el número inicial de siembra. Se observa inducción de muerte celular en todas las dosis, aunque a dosis más altas mayor porcentaje de muerte celular (Figura 18, 19 y 20). Estos datos sugieren que los extractos frenan la proliferación vía inducción de muerte celular tanto de las líneas celulares tumorales como la de las células normales. Por otro lado es evidente la diferencia morfológica con respecto a los controles de cada línea celular, debido al daño en la morfología y estructura celular, así como la aparición de cuerpos apoptóticos, todos son efectos derivados del estímulo con todos los extractos, en las diferentes líneas celulares y en las células normales (Figura 21, 22 y 23). De manera específica vemos que todos los chayotes silvestres parecen inducir apoptosis en diferente grado a cada línea celular (Tabla 3). Esto indica que los extractos de chayotes silvestres llevan a las células tumorales y normales a realizar el proceso de muerte celular por apoptosis. Este dato es importante destacarlo ya que este tipo de muerte se presenta en nuestro organismo de forma natural y en cuestiones de tratamiento reduce los nocivos efectos secundarios reflejando menos problemas a la salud en general; de igual forma sería interesante evaluar de manera específica el mecanismo de muerte que realizan las células debido al estímulo con los extractos de chayote como lo son: alteraciones citomorfológicas, fragmentación de ADN, detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores, alteraciones de membrana (exposición de fosfatidilserina) ó liberación de citocromo (Elmore, 2007).

Cabe resaltar el potencial antiproliferativo de los extractos aquí evaluados si se considera que el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos considera que los extractos crudos con IC_{50} menor a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son agentes con potencial anticancerígeno (Boik, 2001). Los extractos aquí evaluados, no solo están en este rango sino que incluso

cumplen el criterio de interés oncológico como si se tratara de moléculas puras, cuyo nivel de IC₅₀ es menor a 4 µg/mL (Boik, 2001). Incluso muy por debajo de la actividad de extractos de 76 plantas, incluyendo a *Momordica balsamina* que es una cucurbitacea, con una concentración de 50 µg/mL sobre la línea celular de cáncer de pecho MCF7, de los cuales solo 3 especies mostraron un efecto citotóxico con IC₅₀ menor a 20 µg/mL (Abu-Dahab *et al.*, 2007).

Finalmente, aun cuando se desconocen en particular las moléculas responsables de la actividad antiproliferativa presentes en las especies silvestres, se sabe que *Sechium edule* contiene compuestos como fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas, peroxidases, esteroides, terpenos y cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005, Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, anti-oxidantes, antiviral y efectos antitumorales (Salama *et al.*, 1986; Yen *et al.*, 2001; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2004 y Ordoñez *et al.*, 2006); y cabe mencionar que la actividad anticancerígena de muchas cucurbitáceas se atribuye a la presencia de triterpenos, específicamente las cucurbitacinas (Jayaprakasam *et al.*, 2003; Attard *et al.*, 2004; Bartalis *et al.*, 2005; Dantas *et al.*, 2006; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007a; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), debido a la citotoxicidad mostrada en diversas líneas celulares tumorales, demostrando ser promisorios agentes antineoplásicos (Ito *et al.*, 2002; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Attard *et al.*, 2004; Bartalis *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007b). Por lo cual es posible que las especies silvestres también contengan algunos de estos fitoquímicos; ya que la actividad de los extractos sobre las células puede deberse a la presencia de múltiples metabolitos, que se encuentran en forma de mezcla compleja y que actúan sinérgicamente (Pezzuto, 1997).

Debido a lo anterior sería interesante realizar posteriormente un estudio fitoquímico para confirmar esta hipótesis o si es solo una la molécula responsable del efecto biológico. Aunado a esto se sabe que el extracto etanólico de algunas plantas, al combinarse con agentes antineoplásicos clásicos, eliminan células tumorales de forma más eficiente al sinergizar su efecto biológico (Sharabani *et al.*, 2006). Por ello también sería interesante evaluar si los extractos de chayote puedan coadyuvar en una sinergia de efecto antineoplásico con moléculas anticancerígenas clásicas y así poder reducir las dosis de tratamiento.

Conclusiones

- Los extractos de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISeM reducen la proliferación celular de forma dosis-dependiente de las líneas celulares HeLa y L929, así como de fibroblastos normales.
- La evaluación con las técnicas de Cristal Violeta y Sulforodamina-B demostraron que ambas técnicas son equiparables para la evaluación de proliferación celular.
- En general los extractos del híbrido H-387-07-GISeM y el *S. chinantlense* sin espinas (s/e), al requerir menor concentración para reducir al 50 % la proliferación celular (IC_{50}), son los que presentan mayor potencial antiproliferativo sobre las líneas celulares por lo tanto una clara disminución de la viabilidad.
- Todos los extractos inducen la formación de cuerpos apoptóticos sobre las líneas celulares HeLa y L929 así como en fibroblastos normales.
- Los extractos de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y el híbrido H-387-07-GISeM presentan un mayor efecto antiproliferativo en comparación al reportado para las variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw.; confirmando que hay un efecto diferencial en cuanto a las especies y variedades de chayote.

Bibliografía

- Abdelnour, A.; Ramírez, C.; Engelmann, F. (2002). Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. Agron. Mesoam. 2(13):147-151.
- Abu-Dahab, R.; Afifi, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). Sci. Pharm. Austria. 75:121-136.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; y Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition. Garland Sci. USA. pp. 1463.
- Alfaro, M.; García, C.; Dueñas, G. (2000). Métodos de detección de la apoptosis; aplicaciones y limitaciones. Rev. Inst. Nal. Cancer. 46(4):275-280.
- Attard, E.; Cuschieri, A.; Scicluna-Spinteri, A.; Brincat, M.P. (2004). The effects of cucurbitacin E on two lymphocyte models. Pharm. Biology. 42(2):170-175.
- Balandrin, M.F.; Klocke, J.A.; Wurtele, E.S.; Bollinger, W.H. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science. 228(4704):1154-1160.
- Balunas, J.M.; Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 78(5):431-441.
- Bartalis, J.; Halaweish, F.T. (2005). Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. J. Chromatography B, Biomed. App. 818(2):159-166.

- Boik, J. (2001). Natural Compounds in Cancer Therapy. Oregon Medical Press. USA. pp. 25.
- Bye, R.; Estrada, E.; Linares, E. (1992). Recursos genéticos en plantas medicinales de México. *In*: Estrada, E. (ed). Plantas Medicinales de México, Introducción a su Estudio. 4ª ed. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 362-370.
- Cadena-Iñiguez, J. (2005). Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Texcoco. México.
- Cadena-Iñiguez, J.; Soto-Hernández, M.; Ruiz-Posadas, L.M.; Santiago-Osorio, E.; Campos-Ángeles, G.; Barriga, V.; Torres, A.C. (2005). Efecto de extractos etéreos de cinco ecotipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) en diferentes líneas tumorales. *In*: Memorias del IV Seminario Internacional Efraín Hernández Xolocotzin in memoriam. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
- Cadena-Iñiguez, J.; Avendaño-Arrazate, C.H.; Soto-Hernández, M.; Ruiz-Posadas, L.M.; Aguirre-Medina, J.F.; Arévalo-Galarza, L.; Santiago-Osorio, E.; Acosta-Ramos, M.; Cisneros-Solano, V.M.; Ochoa-Martínez, D. (2007). Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *In*: Fresh Produce. Teixeira da Silva, J. (ed). Glob. Sci. Books. 1(1):41-53.
- Cadena-Iñiguez, J.; Avendaño-Arrazate, C.H.; Soto-Hernández, M.; Ruiz-Posadas, L.M.; Aguirre-Medina, J.F.; Arévalo-Galarza, L. (2008). Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw in the state of Veracruz, México. Genetic Resour. and Crop Evol. 55(6):835–847.
- Cambar, P.; Portillo, P.; Tabora, E.; De Pineda, L.; Tovar, O.; Casco, J.; Alvarado, C.; Díaz, G.; Casco, B.; Cantillo, L. (1980). Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. Rev. Med. Hondur. 48:97-99.

- Cañigueral, S.; Dellacassa, E.; Bandoni, A. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. *Lat. Am. J. Pharm.* 22(3):265-278.
- Chen, J.; Tian, R.; Qiu, M.; Lu, L.; Zheng, Y.; Zhang, Z. (2008). Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry*. 69(4):1043-1048.
- Cordell, G.A.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. (1993). Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. *In*: Colegate, S.M.; Molyneux, R.J. (ed). *Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structural determination*. CRC Press. London. 196-219.
- Cragg, G.M.; Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 100(1-2):72-79.
- Cross, H.B. (2003). Evolution, systematics and domestication in *Sechium* and related genera (Sicyeae, Cucurbitaceae). Tesis doctoral. Columbia University. U.S.A.
- Dantas, I.N.; Gadelha, G.C.M.; Chaves, D.C.; Monte, F.J.Q; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; Costa-Cotufo, L.V. (2006). Studies on the cytotoxicity of cucurbitacins isolated from *Cayaponia racemosa* (Cucurbitaceae). *Z. Naturforsch C. Biosciences*. 61(9-10):643-646.
- Diré, G.; Lima, E.; Gomes, M.; Bernardo, F.M. (2003). The effect of a chayotte (*Sechium edule*) extracts (decoct and macerated) on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an *in vitro* and *in vivo* analysis. *Pakistan J. Nutr.* 2(4):221-227.
- Dubin, M.; Stoppani, A. (2000). Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina*. 60:375-386.

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35(4):495-516 .
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2(5):1084-1104.
- Fink, S.L.; Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73(4):1907-1916.
- Flores, E.M. (1989). El chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (cucurbitaceae). *Rev. Biol. Trop.* 37(1):1-54.
- Gillies, R.G.; Didier, N.; Dentosn, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159(1):109-113.
- Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México [GISeM]. (2008). Colecta, caracterización y conservación de *Sechium* spp. Informe en extenso. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos-SAGARPA. México, D.F. pp. 102.
- Guppy L.J.; Gordon E.A.; Nelson M. (2000). The antihypertensive effects of the jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Med. J.* 49(1):27-31.
- Hostettmann, K.; Marston, A.; Wolfender, J.L. (1995). Strategy in the search for new biologically active plant constituents. *In*: Hostettmann, K.; Marston, A.; millard, M.; Hamburger, M. (ed.). *Phytochemistry of plants used in traditional medicine.* Oxford Sci. Publications. 37:17-45.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2008). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/lib/buscador>.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2010). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. Sala de prensa. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e=>.

- Ito, A.; Chai, H.B.; Lee, D.; Kardono, L.B.S.; Riswan, S.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. (2002). Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins of *Elaeocarpus mastersii*. *Phytochemistry*. 61(2):171-174.
- Jayaprakasam, B.; Seeram, N.P.; Nair, M.G. (2003). Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacinas from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett*. 189(1):11-16.
- Jensen, L.P.; Lai, A.R. (1986). Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 155(5):1048-1049.
- Jiménez, G. (2003). *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*. 22:100-106.
- Karp, G. (1998). *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 746:671.
- Kroemer, G.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; Peter, M.E.; Vaux, D.; Vandenabeele, P.; Zhivotovsky, B.; Blagosklonny, M.V.; Malorni, W.; Knight, R.A.; Piacentini, M.; Nagata, S.; Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell. Death. Differ*. 12(2):1463-1467.
- Li, D.; Ikeda, T.; Nohara, T.; Liu, J.; Wen, Y.; Sakamoto, T.; Nonaka, G. (2007a). Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *Siraitia grosvenori*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 55(7):1082-1086.
- Li, H.; Wang, L.J.; Qiu, G.F.; Yu, J.Q.; Liang, S.C.; Hu X.M. (2007b) Apoptosis of HeLa cells induced by extract from *Cremanthodium humile*. *Food and Chem. Toxicol*. 45(10):2040-2046.

- Li, J.; Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27(48):6194-6206.
- Ling, Y.H; Priebe, W.; Perez-Soler, R. (1993). Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells . *Cancer Res*. 53(8):1845-1852.
- Lira-Saade, R. (1996). Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. *Int. Plant Gen. Resources Inst. Italy*. pp. 58.
- Lira-Saade, R.; Castrejón, J.; Zamudio, S.; Rojas-Zenteno, C. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana*. 49:47-61.
- Mans, D. R.A.; da Rocha, A.B.; Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 5(3):185-198.
- Miletic, I.; Devcic, N.; Anic, I.; Borcic, J.; Karlovic, Z.; Osmak, M. (2005) The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J. Endod*. 31(4):307-309.
- Monroy-Vázquez, M.E.; Soto-Hernández, M.; Cadena-Iñiguez, J.; Santiago-Osorio, E.; Ruiz-Posadas, L.M.; Rosas-Acevedo, H. (2009). Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*. 43(8):777-790.
- Morgan, S.J.; Darling, D.C. (1993). Cultivo de células animales. *Acriba*. España. pp. 159.
- National Cancer Institute [NCI]. (2008). El cáncer: preguntas y respuestas. Hoja informativa 6.7s. Disponible en: <http://www.cancer.gov/publications>.
- Newstrom, L.E. (1991). Evidence for the origin of chayote, *Sechium edule* (Cucurbitaceae). *Econom. Botany*. 453:410-428.

- Ordoñez, A.A.L.; Gómez, J.D.; Cudmani, N.M.; Vattuone, M.A.; Isla, M.I. (2003). Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Microb. Ecol. Health Dis. 15(1):33-39.
- Ordoñez, A.A.L.; Gómez, J.D.; Vattuone, M.A.; Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. extracts. Food Chem. 97(3):452-458.
- Ortega-Paczka, R.; Martínez-Alfaro, M.A.; Rincón-Enríquez, G. (1998). Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de fitotecnia. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. pp. 321.
- Pardo, F.J. (1998). Anatomía, patología general y especial de las neoplasias. Científico-Médica. España. pp.355.
- Pezzuto, J.M. (1997). Plant-derived anticancer agents. Biochem. Pharm. 53:121-133.
- Pizarro, A. (2006). Glicoproteína P como factor pronóstico y objetivo terapéutico en pacientes con leucemia mieloide aguda. Curso Teórico y Seminarios de Oncología Básica. Medwave. Ed. Oct. Chile.
- Potten, C.; Wilson, J. (2004). Apoptosis; the life and death of cell. Cambridge University Press. Pg XII preface. USA.
- Rivera, M. A.R. (2010). Efecto de extractos crudos de *Sechium edule* (Jacq) Sw. sobre la proliferación de la línea celular HeLa. Reporte de servicio social. Carrera de Biología. FES-Zaragoza. UNAM.
- Salama, M.A.; Polo, N. A.E.; Contreras, M. C.R.; Maldonado, R.L. (1986). Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de *Sechium edule*. Rev. Col. de Ciencias Químico-farmacéuticas. 15:79-82.

- Salas, M.B.; Torres, M.A. (2007). Efecto de extractos de diferentes variedades de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en la proliferación de diferentes líneas tumorales. Reporte de servicio social. Carrera de Biología. FES-Zaragoza. UNAM.
- Setzer, W.N.; Setzer, M.C. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Reviews in Med. Chem.* 3(6):540-556.
- Sharabani, H.; Izumchenko, E.; Wang, Q.; Kreinin, R.; Steiner, M.; Barvish, Z.; Kafka, M.; Shaoni, Y.; Levy, J.; Uskokovic, M.; Studeinski, G.; Danilenko, M. (2006). Cooperative antitumor effects of Vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int. J. Cancer.* 118:3012-3021.
- Siciliano, T.; De Tomáis, N.; Morelli, I; Braca, A. (2004). Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52(21):6510-6515.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82(13):1107-1112.
- Sosa N. (2008). Evaluación del efecto de extractos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) sobre la proliferación y citotoxicidad en las líneas celulares tumorales L929 y HeLa. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- Tallamy, D.W.; Krischik, V.A. (1989). Variation and function of cucurbitacins in *Cucurbita*: an examination of current hypotheses. *The Am. Naturalist.* 133(6):766-786.
- The American Type Culture Collection [ATCC], The Global Bioresource Center. Disponible en: www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas.asp
- Vega, A.E.; Velasco, L.R.; Jiménez, E.M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica.* 31(3):97-111.

- Wang, D.C.; Xiang, H.; LI, D.; Gao, H.; Cai, H.; Wu, L.J.; Deng, X.M. (2008). Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv. *dayangua*. *Phytochemistry*. 69(6):1434-1438.
- Watada, A.E.; Herner, R.C.; Kader, A.A.; Romani, R.J.; Staby, G.L.; (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience*. 19(1):20-21.
- World Health Organization [WHO]. (2007). *World Health Statistics*. Francia. pp. 12. Disponible en: <http://www.who.int/whosis>.
- Wu, T.H.; Chow, L.P. y Lin, J.Y. (1998). Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. purification, characterization, molecular cloning and expression. *Eur. J. Biochem*. 255(2):400-408.
- Wu, P.L.; Lin, F.W.; Wu, T.S.; Kuoh, C.S.; Lee, K.H.; Lee, S.J. (2004). Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. *Chem. and Pharmaceutical Bulletin*. 52(3):345-349.
- Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*. 275(3):62-70.
- Yen, G.C.; Chen, H.Y. y Peng, H.H. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxic*. 39(11):1045-1053.
- Yocota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Life Sci. Carcinogenesis*. 21(3):497-503.
- Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L.; Patiño, A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28:227-236.

Catálogo de autoridades taxonómicas de las cucurbitáceas (Cucurbitaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto DS002. México. pp. 9. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/informacion/catalogo_autoridades/doctos/curcubitace.

www.botanical-online.com/chayotes.htm

www.forocancer.com.ar/

Apéndice A

1.- Dilución de extractos

Se pesan 71.2 mg del extracto crudo y se coloca en un eppendorf, nuevo, estéril y etiquetado al cual se le adicionan 40 μ L de etanol al 96°.

El vial se agita vigorosamente en un vórtex (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) para facilitar la solubilización del extracto.

Aforar a 1 mL con PBS (Apéndice B) y agitar en el vórtex para homogenizar la muestra.

Centrifugar (Beckman, TJ-6, USA) el extracto solubilizado a 2000 rpm durante 5 min, se colecta el sobrenadante en un eppendorf nuevo y se etiqueta como stock 1.

Tomar del stock 1, 200 μ L y vaciar a otro eppendorf, adicionar 400 μ L de PBS y etiquetar como stock 2.

Del stock 2 se toman 0.4, 2, 4, 10 y 20 μ L que corresponden a 40, 230, 470, 1180 y 2370 μ g/mL para realizar los ensayos biológicos.

De ser necesario se toman 12.5 μ L del stock 2 y adicionar 725 μ L de PBS para formar el stock 3. Del stock 3 se toman 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 μ L que corresponden a 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 μ g/mL para realizar los ensayos biológicos.

De ser necesario se toman 50 μ L del stock 3 y adicionar 750 μ L de PBS para formar el

stock 4. Del stock 4 se toman 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 μL que corresponden a 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para realizar los ensayos biológicos.

Después de realizar las diluciones y antes del ensayo biológico, se esterilizan los extractos en luz UV por 30 min.

2.- Resiembra celular.

Las células se mantienen en cultivo en cajas petri de 5 mL con medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) de Invitrogen GIBCO-BRL.(Apéndice B), suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) en condiciones de esterilidad dentro de una incubadora (Thermo Forma, USA) a 37° C, atmosfera al 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

El proceso de resiembra de una población de células adherentes consiste en retirar el sobrenadante de cultivo, adicionar 3 mL de verseno y se introduce en la incubadora por 3 min. Para colectar las células se resuspende las células en la solución de verseno y una vez resuspendidas se colocan en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugan por 5 min a 2000 rpm.

Desechar el sobrenadante y el botón celular se resuspende en 2 mL de PBS y se centrifuga, para posteriormente de nuevo resuspender el botón en 2 mL de medio de cultivo fresco para proceder al conteo celular.

El conteo celular se realiza después de obtener una muestra homogénea mediante la resuspensión. Se toma una muestra de 20 μL en un eppendorf donde se adicionan 20 μL de azul tripano, resuspender y tomar 20 μL de muestra para colocarla en el hemocitómetro, contar y calcular la densidad celular de resiembra.

De las células cosechadas se resiembra 1×10^5 células/mL en el caso de HeLa, L929 y fibroblastos normales, que se depositan en una nueva caja petri con medio fresco y 10 % de SFB.

3.- Ensayo biológico.

Para el ensayo biológico, se parte del botón de células contadas y se toman los microlitros (μL) necesarios para obtener la densidad de ensayo, la cual es de 2×10^4 células/mL para HeLa, L929, y fibroblastos normales.

Se utilizan placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA), donde se colocan 200 μL por pozo de la mezcla de la densidad celular deseada incluyendo medio fresco y 10 % de SFB.

El medio con células para el ensayo se resuspenden al menos 15 veces con una pipeta de vidrio de 5 mL en una caja petri de 10 mL y después con la micro pipeta multicanal se toman 200 μL /pozo y se depositan en la placa de 96 pozos, teniendo cuidado de que el plaqueo sea homogéneo.

Una vez lista la placa con las células, se procede a estimularlas, (pozo a pozo) adicionando las diferentes concentraciones del extracto a evaluar. En este caso se tomaron del stock 4.

Se deja la placa con células y estímulo incubar en las condiciones ya mencionadas por 72 horas. Al término de este tiempo se evalúa el efecto de los extractos sobre las líneas celulares, por medio de 2 técnicas, según sea el objetivo a evaluar.

3.- Evaluación de la proliferación.

La evaluación se realiza por medio de una técnica colorimétrica, llamada "**CRISTAL VIOLETA**", por usar a dicho colorante de SIGMA-ALDRICH.

Transcurridas las 72 horas se retira la placa de cultivo de la incubadora, se balancea con otra placa y se centrifuga (HERMLE Z320) por 5 min a 2000 rpm.

Después de centrifugar se desecha el sobrenadante (medio de cultivo). En todos los casos utilizando una micropunta de 200 μ L unida a la manguera de una trampa de vacío y conectada a una bomba de vacío, la succión se realiza con la micropunta pegada a las paredes de cada pozo y evitando remover las células del fondo.

Las diferentes soluciones agregadas a la placa de cultivo se realizan con una micropipeta multicanal, vaciando suavemente por las paredes del pozo y en el caso de los colorantes, por el centro de cada pozo y sin remover las células del fondo.

Adicionar 50 μ L de glutaraldehído al 1.1 % (Apéndice B) por pozo y dejar fijar las células por 2 horas. Retirar el glutaraldehído al 1.1 % de los pozos, con la bomba de vacío. Posteriormente adicionar 50 μ L del colorante cristal violeta 0.1 % (Apéndice B) por pozo durante 1 min. Dicho colorante tiñe el ADN del núcleo de las células ya fijadas. Retirar rápida y cuidadosamente el exceso de colorante con la bomba de vacío.

Realizar 5 lavados con 100 μ L de agua destilada por pozo, entre cada lavado retirar el agua con la bomba de vacío.
Dejar secar la placa totalmente.

Adicionar 50 μ L de ácido acético al 10 % (Apéndice B) por pozo y durante 20 min dejarla en un agitador de placas (Labnet International Inc. Woodbrigr, NY., USA) con el fin de solubilizar el colorante incorporado por las células.

La absorbancia es determinada con un lector de placas (Tecan-Spectra, Image, Germany) a 570 nm. A mayor absorbancia, mayor número de células, por ello con esta técnica podemos observar la proporción de células presentes en cada pozo de cultivo y refleja el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular.

4.- Evaluación de la proliferación

La evaluación se realiza por medio de una técnica colorimétrica, llamada "**SULFORODAMINA B (SRB)**", por usar a dicho colorante de SIGMA-ALDRICH.

Transcurridas las 72 horas se retira la placa de cultivo de la incubadora, balancear con otra placa y se centrifuga (HERMLE Z320) por 5 min a 2000 rpm.

Con una micropipeta multicanal, adicionar sobre el medio de cultivo de cada pozo, 32 μ L de ácido tricloroacético al 50 % (Apéndice B) frío para Hela, L929, y fibroblastos normales. Dejar fijar las células por 2 horas a 4° C.

Retirar el sobrenadante (medio de cultivo y ácido tricloroacético al 50 %) con la bomba de vacío, cuidando no tocar el fondo para evitar perder células.

Realizar 5 lavados con 100 μ L de agua destilada por pozo, entre cada lavado retirar el agua con la bomba de vacío, para retirar el exceso de ácido tricloroacético.

Dejar secar la placa totalmente.

Adicionar a cada pozo 50 μ L del colorante SRB 0.4 % (Apéndice B). Y dejar que se tiñan las células por 10 min.

Retirar rápidamente el exceso de colorante con la bomba de vacío.

Realizar 5 lavados con 100 μ L de ácido acético al 1 % (Apéndice B) por pozo, entre cada lavado retirar el sobrenadante con la bomba de vacío, para retirar el exceso del colorante. Dejar secar la placa totalmente.

Finalmente adicionar 50 μ L de TRIS Base 10 mM (Apéndice B) por pozo y colocar la placa en un agitador por 20 min con el fin de solubilizar el colorante incorporado por las células.

La absorbancia es determinada con un lector de placas (Tecan-Spectra, Image, Germany) a 570 nm.

A mayor absorbancia, mayor número de células, por ello con esta técnica podemos observar la proporción de células presentes en cada pozo de cultivo y refleja el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular y citotoxicidad.

Apéndice B

- PBS (solución estabilizadora de fosfatos)

Esta solución de sales de fosfato proporciona la capacidad estabilizadora a dicha solución. Para preparar 1 L.

-Agua bidestilada	1.0 L
-Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA)	8.0 g
-Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA)	0.2 g
-Fosfato monoácido de sodio (Na ₂ HPO ₄) (Sigma, Chem, USA)	2.16 g
-Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄) (Sigma, Chem, USA)	0.2 g

Las sales de NaCl, KCl y KH₂PO₄ se disuelven completamente una por una en 800mL de agua bidestilada. Una vez disuelto todo se ajusta el pH de 7.2-7.4 con Na₂HPO₄ y se afora al volumen final de 1 L. Se vacía en botellas de vidrio para esterilizarlas por autoclave, dejar enfriar y almacenar a 4°C.

- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

Esta solución es el medio de cultivo para las líneas celulares. Para preparar 1 L.

-Agua bidestilada	1 L
-Iscove's	1 sobre, aprox. 17.7 g
-Bicarbonato de sodio (Na ₂ HCO ₃)	3.024 g
-Penicilina-Streptomycin	0.031 g

El sobre de IMDM se disuelve poco a poco en 800mL de agua bidestilada, una vez disuelto completamente se adiciona el bicarbonato de sodio, aforar a 1 L y dejar en agitación por 15 min. La solución se filtra por medio de una membrana (Millipore) con diámetro de 0.22 µm, en un ambiente estéril.

Vaciar a botellas estériles, adicionar la Penicilina-Streptomycin. Almacenar a 4°C.

- SFB (Suero Fetal Bovino)

El SFB se inactiva antes de usarse. Para la inactivación se deja a temperatura ambiente hasta su descongelación, posteriormente se pone en un baño de agua a 56°C por 30 min. y se homogeniza suavemente cada 10 min. Separarlo en alícuotas de tubos estériles de 50 mL para un mejor manejo. Almacenar a 4°C.

- Verseno

Esta solución sirve para despegar a las células adherentes. Para preparar 1 L.

-Agua bidestilada	1 L
-Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA)	8.0 g
-Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA)	0.4 g
-EDTA (Sigma, Chem, USA)	0.2 g
-Tris Base (Sigma, Chem, USA)	3.04 g

En 800 mL de agua bidestilada se agregan cada uno de los reactivos hasta su disolución completa. Aforar a 1 L y corroborar que el pH sea de 7.7.

En caso de ser básico utilizar HCl 1N y si es ácido ocupar NaOH. Se vacía a las botellas de vidrio para esterilizarlas por autoclave, dejar enfriar y almacenar a 4°C.

- Glutaraldehído al 1 %

Este reactivo sirve para fijar las células que serán evaluadas en la placa con la técnica de cristal violeta.

Se toman 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) a un frasco ámbar, se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y agitar suavemente. Esta solución se conserva a temperatura ambiente.

- Cristal violeta

Es un colorante que tiñe el ADN de las células.

Se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6 que se prepara al disolver 3.96 g de NaOH a 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución se adiciona 1 g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua bidestilada. Finalmente, la solución cristal violeta se filtra usando papel Whatman #2 y se almacena a temperatura ambiente.

- Ácido acético al 10 % y 1 %

El ácido acético al 10 % sirve para diluir el colorante de las células y ser evaluadas en un lector de placas. Para realizar 100 mL de solución, se toman 90 mL de agua bidestilada y se le agregan 10 mL de ácido acético glacial, y queda al 10 %.

La solución al 1 %, se toman 99 mL de agua bidestilada y se le agrega 1 mL de ácido acético glacial.

- Ácido tricloroacético al 50 %

Este reactivo sirve para fijar las células que serán evaluadas en la placa con la técnica de sulforodamina-B.

Se pesan 50 g de ácido tricloroacético y se diluyen en 100 mL de agua bidestilada.

- Sulforodamina-B (SRB)

Este es un colorante para proteínas. Se prepara al pesar 0.4 g del colorante SRB y diluir en 100 mL de ácido acético al 1 %, agitar hasta su dilución.

- Tris base 10 mM

Con esta solución se diluye el colorante SRB de las células para evaluar la placa en el lector de placas. Se pesan 0.1211 g de Tris base y diluir en 100 mL de agua bidestilada, agitar hasta su dilución.

- Alcohol al 70 %

El alcohol a esta concentración se utiliza para desinfectar material y áreas de trabajo.

Para preparar 1 L:

Se vacían 700 mL de alcohol al 96% en un frasco y se agregan 300 mL de agua bidestilada.

- Giemsa al 10 %

Colorante para teñir las células y evaluar la morfología.

Para preparar 10 mL, se toma 1 mL del colorante y se vacía a un tubo al cual se le agregan 9 mL de agua bidestilada quedando a una concentración al 10 %.

Apéndice C

IC₅₀ (µg/mL) cristal violeta

	Ecuación	HeLa
<i>S. compositum</i> fresco	$f(x) = -36.5874482149591x + 113.347284798955$ $R^2 = 0.912701516467539$	1.73
<i>S. compositum</i> seco	$f(x) = -66.8481073756811x + 103.841658088941$ $R^2 = 0.973215295024672$	0.8
<i>S. chinantlense</i> fresco	$f(x) = -78.8144885387696x + 108.3071449748$ $R^2 = 0.963362910393872$	0.73
<i>S. chinantlense</i> seco	$f(x) = -59.8752097860935x + 107.405661281358$ $R^2 = 0.887063613456328$	0.95
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	$f(x) = -271.328451059139x + 102.525070554197$ $R^2 = 0.985956645220125$	0.19
H-387-07-GISeM	$f(x) = -255.856183215255x + 103.116578887023$ $R^2 = 0.991222514540977$	0.2

IC₅₀ (µg/mL) cristal violeta

Ecuación		L929
<i>S. compositum</i> fresco	$f(x) = -8.21134451068844x + 102.363042197087$ $R^2 = 0.990806089482046$	6.37
<i>S. compositum</i> seco	$f(x) = -10.1816480057834x + 96.540856390858$ $R^2 = 0.968556402523546$	4.57
<i>S. chinantlense</i> fresco	$f(x) = -11.883163431233x + 94.9432812095268$ $R^2 = 0.967356737583619$	3.78
<i>S. chinantlense</i> seco	$f(x) = -9.7655333838585x + 97.6209695221049$ $R^2 = 0.973262489296737$	4.87
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	$f(x) = -22.6473636922037x + 91.9175719130221$ $R^2 = 0.84426600450092$	1.85
H-387-07-GISeM	$f(x) = -18.9828808466032x + 82.7578501717462$ $R^2 = 0.716475126711958$	1.72

IC₅₀ (µg/mL) cristal violeta

Ecuación		Fibroblastos
<i>S. compositum</i> fresco	$f(x) = -40.6694839857651x + 104.422542259786$ $R^2 = 0.92267292064372$	1.33
<i>S. compositum</i> seco	$f(x) = -66.5589535539745x + 99.010799553122$ $R^2 = 0.980080249824138$	0.73
<i>S. chinantlense</i> fresco	$f(x) = -84.9844557048787x + 105.041492252332$ $R^2 = 0.89501045198842$	0.64
<i>S. chinantlense</i> seco	$f(x) = -55.5155548282696x + 106.658736452551$ $R^2 = 0.945892185560302$	1.02
<i>S. chinantlense</i> sin espinas	$f(x) = -443.476251007094x + 107.264415636958$ $R^2 = 0.888275230596567$	0.12
H-387-07-GISeM	$f(x) = -398.739648655806x + 103.154660274442$ $R^2 = 0.971495819025659$	0.13