



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia

**Valoración de parámetros bioquímicos y hematológicos en
ratones sanos tratados con extractos de *Sechium* spp.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA
P R E S E N T A
GUADALUPE GÓMEZ GARCÍA

Directora de Tesis: M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez





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, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES-Zaragoza, UNAM. Bajo de dirección de la M en C. Itzen Aguiñiga Sánchez. Con el apoyo financiero del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF, PICSA 10-156), el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM) y el Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos y la Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA-SINAREFI). Apoyo de Beca para Tesis del proyecto ICYTDF, PICSA 10-156.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez por el apoyo, paciencia y guía brindados durante este tiempo, gracias por toda la enseñanza y por brindarme la oportunidad de trabajar con este recurso maravilloso *huitzayotl*.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por su orientación y apoyo, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formar parte del grupo de trabajo.

A Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez y Dra. Mirna Ruíz Ramos por el apoyo brindado, y por permitirme desarrollar parte de mi trabajo experimental en su laboratorio.

A los miembros del jurado integrado por el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, la M en C. Rosalva Rangel Corona, el Dr. Mario A. Altamirano Lozano, el M. en C. Arturo Cano Flores y la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez; quienes con sus valiosas aportaciones enriquecieron y guiaron para la culminación de este trabajo.

Al Bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM, por el apoyo brindado, con el suministro de animales para este trabajo, en especial a la MVZ. Adriana Altamirano Bautista y el MVZ. Román Hernández Meza.

A todos y cada uno de los miembros del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia FES-Zaragoza, UNAM, gracias por el valioso apoyo brindado durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

A mis padres Pablo Gómez de la Rosa y María Teresa García Martínez quienes con su comprensión y apoyo incondicional hicieron que este trabajo fuera posible.

A mis hermanos Paola Gómez García y Oscar E. Gómez García que han sido guía y ejemplo a seguir, gracias por todo el apoyo brindado

A mi cuñada Catalina Sánchez por su apoyo y a los dos angelitos Evelyn y Giselle que me dan luz y fortaleza para continuar cada día.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. TUMORES MALIGNOS.....	3
2.2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	4
2.3. DIABETES MELLITUS.....	4
2.4. FUNCIONES METABÓLICAS INDICADORAS DE TOXICIDAD	5
2.4.1. Glucosa.....	5
2.4.2. Ácidos Grasos	7
2.4.3. Funcionamiento hepático	9
2.4.5. Funcionamiento renal.....	11
2.4.6. Funcionamiento del tejido sanguíneo.....	13
2.5. LAS PLANTAS COMO ALTERNATIVA TERAPEUTICA	16
2.5.1. Género <i>Sechium</i>	16
2.5.2. Especies Silvestres	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
6. OBJETIVO GENERAL	26
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
7. MATERIAL Y MÉTODOS	28
7.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO	28
7.2. TRATAMIENTO.....	28
7.3. COLECCIÓN DE MUESTRAS	29
7.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	29
7.4.1. Urea.....	29
7.4.2. Creatinina	30
7.4.3. Ácido úrico.....	30
7.4.4. Colesterol	31
7.4.5. Triglicéridos	31
7.4.6. Glucosa.....	31
7.4.7. Bilirrubina total	32
7.4.8. Aspartato aminotransferasa (AST).....	32

7.4.9. Alanina aminotrasferasa (ALT).....	33
7.5. BIOMETRÍA HEMÁTICA.....	33
7.6. ÍNDICE MITÓTICO.....	33
7.7. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE ESPLÉNICO, HEPÁTICO Y TÍMICO	34
7.8. DISEÑO ESTADÍSTICO	35
8. RESULTADOS.....	36
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
10. CONCLUSIONES.....	56
11. BIBLIOGRAFIA.....	57
12. ANEXO 1.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos Varietales de <i>Sechium edule</i> en México	18
Figura 2. Variación de color de frutos de <i>Sechium chinantlense</i>	21
Figura 3. Variación morfológica de frutos de <i>Sechium compositum</i>	22
Figura 4. Gráfica de concentraciones plasmáticas de glucosa de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	36
Figura 5. Conteo total de eritrocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	38
Figura 6. Conteo total de leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	41
Figura 7. Conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	42
Figura 8. Índice mitótico de células de médula ósea de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	43
Figura 9. Bazos de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	44
Figura 10. Hígados de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	45
Figura 11. Timos de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de AST, ALT y Bilirrubina total de los ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	34
Tabla 2. Concentraciones plasmáticas de urea, creatinina y ácido úrico de los ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	35
Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	37
Tabla 4. Parámetros hematológicos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	39
Tabla 5. Parámetros hematológicos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	40
Tabla 6. Índice esplénico, hepático y tímico de ratones tratados con extractos de <i>Sechium</i>	47

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ALT	Alanina Aminotransferasa
Ara-C	Citarabina: arabinofuranosilicitocina
AST	Aspartato Aminotransferasa
BANGeSe	Banco Nacional de Germoplasma de <i>Sechium edule</i>
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
CRUO-UACH	Centro Regional Universitario de Oriente de la Universidad Autónoma de Chapingo
DM	Diabetes Mellitus
DOF	Diario Oficial de la Federación
ENT	Enfermedades no transmisibles
GB	Glóbulos Blancos
G-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos*
GISeM	Grupo Interdisciplinario de Investigación en <i>Sechium edule</i> en México
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocito – Macrófago*
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Media*
Hct	Hematocrito
HDA	Hormona Antidiurética
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad*
HeLa	Línea celular de cáncer de cérvix humano
IDF	Federación Internacional de Diabetes*
IL-3	Interleucina 3
IM	Índice Mitótico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INF	Interferón
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IPCS	Programa Internacional de Seguridad Química*
J774	Línea celular de leucemia macrofágica de ratón
L929	Línea celular de fibrosarcoma de pulmón de ratón
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad*
M-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos*
NRC	Consejo Nacional de Investigación*
P388	Línea celular de leucemia macrofágica de ratón
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos*
RBC	Conteo de glóbulos rojos*
TGF	Factor de Crecimiento Transformante*
TNF	Factor de Necrosis Tumoral*
VCM	Volumen Corpuscular Medio*
WBC	Conteo de Glóbulos blancos*
WEHI-3	Línea celular de leucemia mielomonocítica de ratón
WHO	Organización Mundial de la Salud*
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica*

*Por sus siglas en ingles.

1. INTRODUCCIÓN

La presión arterial elevada, los altos niveles de glucosa en sangre, el consumo de tabaco, la inactividad física y el sobrepeso constituyen los principales factores de riesgo para desarrollar enfermedades del tipo crónico degenerativas como diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares y cáncer (WHO, 2009), las dos últimas constituyen las principales causas de muerte a nivel mundial a partir de 2010 (INEGI, 2010; WHO, 2007) esto a pesar de la amplia gama de medicamentos que existen para su tratamiento (Setzer *et al.*, 2003).

En la actualidad, se reporta que cerca del 60% de la población mundial usa algún medicamento herbolario como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades (Lyer *et al.*, 2009). Este conocimiento es derivado de farmacopeas y usos tradicionales de las plantas, sin embargo, no todas las plantas descritas cuentan con análisis científicos que sustenten su inocuidad en el organismo.

La inocuidad hace referencia a la preservación de la actividad metabólica normal de los organismos y puede ser evaluada de manera cualitativa y cuantitativa por cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o alteraciones entre los individuos y poblaciones, que se traducen en efectos tóxicos y daños a la salud (NRC, 1992; IPCS, 2000).

En este sentido la Organización Mundial de la Salud ha creado una guía para el análisis de medicamentos herbolarios, donde el daño hematológico, hepático y renal son considerados parámetros importantes para descartar toxicidad y con ello garantizar la

inocuidad de los medicamentos herbolarios, incluyendo los extractos de plantas (WHO, 2000).

La familia Cucurbitaceae es de las más importantes en la cultura Mesoamericana, por la diversidad de especies integradas a la dieta y a la medicina. Dentro de esta familia encontramos al género *Sechium*, que está constituido por ocho especies silvestres y dos domesticadas, dentro de las cultivadas se encuentra a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Lira, 1996), comúnmente conocido como “chayote”, y que por su importancia en la dieta alimentaria, se reporta como antiinflamatorio (Salama *et al.*, 1986); antihipertensivo (Gordon *et al.*, 2000); antimicrobiano (Ordoñez *et al.*, 2003); antioxidante (Ordoñez *et al.*, 2006), antitumoral (Cadena *et al.*, 2013; Aguiñiga, 2013) y hepatoprotector (Firdous *et al.*, 2012).

Sin embargo, no existen reportes científicos que evalúen la inocuidad del género *Sechium*, tema central de este estudio.

2. MARCO TEÓRICO

En México las enfermedades no transmisibles (ENT), también conocidas como enfermedades crónicas, son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido al gran número de casos, a la creciente mortalidad general (González *et al.*, 2007) y a la complejidad y elevado costo de su tratamiento (Córdova *et al.*, 2008; Bodenheimer *et al.*, 2002). A partir de 2005, las enfermedades cardiovasculares (ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), diabetes mellitus y el cáncer representan las tres principales causas de muerte en edad productiva y posproductiva (INEGI, 2011).

2.1. TUMORES MALIGNOS

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). Durante 2011 en México del total de defunciones en el país, 12.9% fueron por algún tumor y de éstos, 93.6% se debieron a neoplasias malignas. Entre los jóvenes menores de 20 años, se observa que el 5.3% fallecieron por algún tumor, ya sea maligno o benigno, de los cuales 86.3% fueron cancerosos (INEGI, 2011).

2.2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares cobran 17.5 millones de vidas al año, en individuos de 65 años y más (INEGI, 2009). Entre las principales causas para el desarrollo de estas enfermedades se encuentra la arterosclerosis, que juega un papel central en tres de las primeras cinco causas de muerte en México. La arterosclerosis es un proceso multifactorial causado por factores de riesgo que dañan al endotelio en forma crónica. Entre las que se encuentran la edad, herencia, el tabaquismo, la vida sedentaria, la dieta no saludable, la elevación de la presión arterial sistémica, sobrepeso y obesidad, la elevación de los niveles de glucosa y lípidos séricos inadecuados (DOF, 2012). En México, la mitad del presupuesto de las instituciones públicas de salud se destina a la atención de enfermedades crónicas. El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estimó que en 2006, el gasto ejercido en atención de diabetes mellitus e hipertensión arterial por el Sector Salud fue de 39 mil millones de pesos (7% del gasto total en salud); gastando 10 mil millones tan solo en enfermedades cardiovasculares (60.3% de su presupuesto) (INEGI, 2012).

2.3. DIABETES MELLITUS

A nivel mundial, durante 2011, la diabetes causó la muerte de 4.6 millones de personas y en Latinoamérica representa 12.3% del total de las defunciones (IDF, 2011; INEGI 2010). La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónica degenerativa, de carácter heterogéneo con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción de insulina, o bien a la acción ineficaz de esta hormona, lo que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos,

proteínas y lípidos a largo plazo, lo que se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos como lo son los ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos (ADA, 2010; DOF, 2000).

Se ha clasificado en DM tipo 1, en la que la mayoría de los casos se deben principalmente a la destrucción de los islotes de las células beta del páncreas, esto provoca la deficiencia en la producción de insulina y por tanto, hiperglucemia crónica, que puede corregirse con la administración de insulina, por lo cual se denomina DM dependiente de insulina; y en DM tipo 2, en la que existe una capacidad residual de secreción de insulina pero los niveles no superan la resistencia que existe en los tejidos, por lo cual se manifiesta la hiperglucemia, este tipo de diabetes inicia durante la etapa adulta y su incidencia se incrementa notablemente durante la vejez (DOF, 2000). Por ser una enfermedad del tipo crónico degenerativo, la DM es un problema de salud pública, debido a las complicaciones secundarias y cuidados hospitalarios que requiere. En México en el año 2010, la DM le costó al país 778 millones 427,475 de pesos (Arredondo *et al.*, 2011).

2.4. FUNCIONES METABÓLICAS INDICADORAS DE TOXICIDAD

2.4.1. Glucosa

El hígado, debido a sus múltiples funciones bioquímicas tiene un papel central en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, en la síntesis y degradación de las proteínas plasmáticas y en el almacenamiento de vitaminas y metales (Baynes *et al.*, 2004a).

El apropiado almacenamiento y liberación de energía durante los estados de alimentación y ayuno son esenciales para la sobrevivencia y son controlados principalmente por la acción de la insulina, esta es una hormona peptídica de 5.8 KDa, y es secretada por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de carbohidratos en circulación. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo, en el hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. Además, la insulina regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos, proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Estas cinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula (Santiel *et al.*, 2001; Avruch, 1998; Olivares *et al.*, 2008). Según criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la diabetes mellitus tipo 2 se considera una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. El proceso se caracteriza por un trastorno metabólico generalizado en el que la hiperglucemia es el factor bioquímico dominante. En su etiopatogenia, en la que mecanismos genéticos y ambientales son clave, hay que considerar un mecanismo dual: por un lado, un estado de resistencia insulínica y por otro, una insuficiencia secretora de las células beta pancreáticas. Ambas circunstancias coexisten en la mayoría de los casos. Para comprender la fisiopatología del proceso es necesario hacer referencia a 4 aspectos fundamentales: a) el hecho anatómico, por el que los vasos arteriales grandes y pequeños se ven involucrados en un proceso aterotrombótico que conduce a la

enfermedad vascular generalizada (infarto de miocardio o cerebral, pie diabético, neuropatía diabética, ceguera e insuficiencia renal crónica progresiva e irreversible); *b*) la base bioquímica, en la que una serie de factores como la glicación no enzimática de proteínas específicas, las vías metabólicas alternativas por la que se genera sorbitol a partir de la aldosa reductasa y los aumentos de diacilglicerol y proteincinasa C, transducen señales que modifican estructural y funcionalmente el endotelio, que es el punto por donde el proceso aterotrombótico se inicia y se mantiene; *c*) los trastornos procoagulatorios, que incrementan la adhesividad y agregabilidad plaquetaria, lo que aumenta la hipercoagulación y disminuye la fibrinólisis, y *d*) el factor inflamatorio, en el que intervienen numerosos componentes humorales y celulares (Olivares *et al.*, 2008; Palma, 2007).

2.4.2. Ácidos Grasos

Las grasas son la principal fuente de energía en el hígado y el músculo, y en los tejidos humanos en general, exceptuando cerebro y hematíes (Baynes *et al.*, 2004b). Son aporte de ácidos grasos esenciales como: linoléico y linolénico (Bérmudez, 2003) y de micronutrientes tales como las vitaminas liposolubles (A, D y E). La forma de almacenamiento y transporte de las grasas son los triglicéridos nombrados así por tener tres moléculas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol por enlaces de éster (Bishop *et al.*, 2006). La hipertrigliceridemia puede derivar de anomalías genéticas, conocidas como hipertrigliceridemia familiar y la secundaria es frecuente en numerosos procesos (Bishop *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2003).

La molécula precursora de ácidos grasos, hormonas esteroideas y la vitamina D, es el colesterol, un alcohol esteroideo no saturado que contiene cuatro anillos y tiene una sola cadena lateral C-H, es sintetizado casi de manera exclusiva por los animales, pero las plantas contienen otros esteroides similares en estructura al colesterol (Freeman, 2005). Es un constituyente vital de las membranas celulares de todos los mamíferos y la molécula precursora de los ácidos biliares, su metabolismo implica varias reacciones de hidroxilación catalizadas por enzimas monooxigenasa del citocromo P450 (Baynes *et al.*, 2004b). El de colesterol deriva de la dieta y también se sintetiza de novo a partir de Acetil-CoA.

La hipercolesterolemia ocurre cuando hay demasiado colesterol en la sangre. No es una enfermedad en sí, sino un trastorno metabólico. El colesterol elevado en la sangre se debe a un aumento en la cantidad de las denominadas lipoproteínas, partículas que transportan el colesterol en el torrente sanguíneo. Existen dos tipos principales de colesterol: El colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) y el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad). La hipercolesterolemia generalmente implica niveles elevados de colesterol LDL con niveles normales o bajos de colesterol HDL en sangre total (Liu *et al.*, 2011).

Los fitoesteroides y los fitoestanoles (formas reducidas de los fitoesteroides) son esteroides de origen vegetal cuya estructura química es muy similar a la del colesterol. Pero los fitoesteroides difieren estructuralmente del colesterol (que posee 27 carbonos, C27) por la presencia de sustituyentes de tipo metilo o etilo en la cadena lateral de la molécula (Salen *et al.*, 1979). Los fitoesteroides son particularmente abundantes en el reino vegetal: están presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los

vegetales conocidos, la literatura describe para los fitoesteroles y fitoestanoles una gran variedad de efectos fisiológicos. Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Ling *et al.*, 1995; AHA, 1997). El efecto mejor caracterizado y científicamente demostrado, es el efecto hipocolesterolémico, tanto a nivel del colesterol total como del colesterol-LDL (Pollak *et al.*, 1981; Valenzuela *et al.*, 2004).

2.4.3. Funcionamiento hepático

Los grupos amino de los α -aminoácidos que constituyen las proteínas se eliminan durante la degradación oxidativa. Pueden ser utilizados para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados, o pueden ser excretados (Alvarez *et al.*, 2005).

La eliminación de los grupos α -amino está catalizada por enzimas denominadas transaminasas, las cuales realizan reacciones de transaminación, esto es, de transferencia de los grupos amino al carbono α del α -cetoglutarato, dejando un cetoácido análogo. En esta reacción se desamina el aminoácido y se amina el α -cetoglutarato, por lo que no hay pérdida de grupos amino. (Gaynor, 2007).

La aspartato aminotransferasa (AST), es una enzima que se encuentra localizada tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial, de allí que se diga que es una enzima bilocular, se encuentra ampliamente distribuida en músculo esquelético, riñón, cerebro y principalmente en hígado y corazón, donde está en mayor concentración. Cualquier alteración en estos tejidos, se verá reflejado en un aumento en el torrente circulatorio de esta enzima, y será directamente proporcional al daño tisular. En pacientes con

afecciones hepáticas se observan las mayores elevaciones de AST, sobre todo en casos de hepatitis con necrosis (Doñate *et al.*, 2000; Baynes *et al.*, 2004c). La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima que tiene como única localización el citoplasma, de ahí que se le denomine unilocular. Su mayor actividad la presenta en el tejido hepático y la menor actividad en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos (en ese orden). Por lo tanto la destrucción o cambio en la permeabilidad de membrana celular provoca la liberación de ALT a la circulación sanguínea. Su aumento se debe principalmente a alteraciones hepática como colestiasis, hepatitis tóxicas o virales. Los niveles séricos de ALT, muestran variaciones nocturnas y pueden cambiar día con día, así como por efecto del ejercicio (Siest *et al.*, 1975).

Cualquier lesión del hígado que produzca histólisis y necrosis causa la liberación de enzimas entre ellas están alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). La medición de estas enzimas hepáticas en suero se usa para evaluar la extensión del daño hepático y para diferenciar la patología hepatocelular (funcional) de la obstructiva (mecánica). La vida media de las enzimas hepáticas es de 63 h para ALT y 18 h para AST (Reichling *et al.*, 1988).

La bilirrubina es un tetrapirrol producto catabólico del grupo hemo, aproximadamente 75% deriva de la hemoglobina de los eritrocitos viejos que son fagocitados por células mononucleares provenientes de médula ósea (Baynes *et al.*, 2004c). La estructura en anillo del grupo hemo se escinde oxidativamente para formar biliverdina por la hemooxigenasa (un citocromo), a su vez, la biliverdina es reducida enzimáticamente a bilirrubina, que finalmente es excretada en la bilis. El incremento de la bilirrubina en plasma (hiperbilirrubinemia) indica las siguientes anomalías hepáticas: Bilirrubina

Total aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina directa indica colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas (Kaplan *et al.*, 1984).

2.4.5. Funcionamiento renal

La determinación de sustancias de nitrógeno no proteínico en la sangre ha sido empleado comúnmente para monitorear la función renal. La urea es el compuesto nitrogenado de más alta concentración en la sangre. Se sintetiza en el hígado a partir de CO₂ y del amoniacó proveniente de la desaminación de aminoácidos en las reacciones del ciclo de la urea. Esta última es el producto excretorio principal del metabolismo de las proteínas. Después de la síntesis en el hígado, la urea es llevada en la sangre hacia el riñón, donde se filtra desde el plasma por el glomérulo. La mayor parte de la urea en el filtrado glomerular se excreta por la orina, aunque hasta 40% se reabsorbe por difusión pasiva durante el paso del filtrado por los túbulos renales. La cantidad reabsorbida depende del flujo de orina y el grado de deshidratación. Pequeñas cantidades de urea (<10% del total) se excretan por el tubo digestivo y la piel (Frank, 2007). El aumento de urea en sangre puede ser debido a un incremento importante del aporte proteico, al aumento del catabolismo proteico, a disminución de la perfusión renal (shock, deshidratación, insuficiencia cardiaca, síndrome hepatorenal), a insuficiencia renal parenquimatosa aguda o crónica o a insuficiencia renal postrenal por obstrucción. La urea sanguínea también disminuye en situaciones de hemodilución y en la insuficiencia hepática, debido a que se sintetiza en el hígado (Fuentes *et al.*, 2003).

La creatinina es el producto final del metabolismo de la creatina se almacena en el musculo y es excretada en la orina. Las concentraciones altas de creatinina se

relaciona con la función renal anormal, en particular cuando se relaciona con la función glomerular. La creatinina se sintetiza sobre todo en el hígado a partir de arginina, glicina y metionina, es transportada al musculo donde se convierte en fosfocreatina, que sirve como fuente de alta energía. El fosfato de creatina pierde el ácido fosfórico (creatina), la creatina pierde agua para formar creatinina que pasa hacia el plasma, se elimina de la circulación por filtración glomerular y se excreta por la orina. Su concentración plásmica es proporcional a la masa muscular del cuerpo. Existe una correlación entre la creatinina plásmica y la creatinina en orina para calcular el grado de insuficiencia glomerular (aclaramiento de creatinina). (Hristova, 2001; Fuentes *et al.*, 2003).

El ácido úrico es el producto final de descomposición del metabolismo de las purinas en los primates superiores como humanos y simios. La mayor parte de los mamíferos tiene la capacidad de metabolizar purinas en alantoinas, un producto final soluble en agua. Las purinas como la adenosina y guanina de la descomposición de ácidos nucleicos ingeridos o de la destrucción de tejido, son convertidas en ácido úrico sobre todo en el hígado. Es transportado por la sangre, partiendo del hígado hacia los riñones donde se filtra a través del glomérulo. La reabsorción del 98 al 100% de ácido úrico en el filtrado glomerular ocurre en los túbulos proximales, los túbulos distales secretan pequeñas cantidades de ácido úrico a la orina. Esta ruta representa casi el 70% de la excreción diaria de ácido úrico. El resto se secreta hacia el tubo digestivo y las enzimas bacterianas se encargan de degradarlo (Frank, 2007; Hristova, 2001; Bishop, 2006). La hiperuricemia es típica del estado crónico de la gota. También se observan los niveles elevados de ácido úrico en la insuficiencia renal crónica, en todas aquellas situaciones en las que se produzca una necrosis celular masiva (quimioterapia de neoplasias

malignas, infartos tisulares extensos) y por efecto de diversos fármacos: diuréticos saluréticos, salicilatos, pirazinamida y metildopa, en el abuso crónico de etanol y por el consumo de dietas ricas en purinas. Existe una hiperuricemia familiar congénita o síndrome de Lesch-Nyhan. La hiperuricemia está presente en casos de hemodilución, como el síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética (HDA), en la xantínuria hereditaria, la porfiria aguda intermitente y por incremento de su eliminación renal debido a ciertos medicamentos (Fuentes *et al.*, 2003).

2.4.6. Funcionamiento del tejido sanguíneo

El tejido sanguíneo se forma por la acción de dos tipos de elementos: la parte sólida, compuesta por glóbulos rojos, blancos y plaquetas, y la parte líquida, que es el plasma sanguíneo. Diariamente millones de células sanguíneas maduras mueren y son eliminadas de la circulación después de desempeñar sus funciones, entre ellas los eritrocitos encargados del transporte de oxígeno, las plaquetas que participan en la coagulación, células blancas como granulocitos, monocitos y linfocitos en la defensa contra patógenos. Como respuesta a lo anterior, el organismo produce un número equivalente de células para ser enviadas a la circulación y de esta forma no interrumpir el funcionamiento. A este proceso continuo de generación de células sanguíneas se le conoce como hematopoyesis (Orkin *et al.*, 2008), y su mantenimiento se fundamenta en la proliferación y diferenciación a partir de un grupo de células conocidas como células troncales hematopoyéticas (Mayani *et al.*, 2007), las cuales tiene la capacidad de auto renovación, alto potencial proliferativo y de comprometimiento (multipotentes) a cualquier linaje sanguíneo sea este mieloide (mielopoyesis) o linfoide (linfopoyesis) (Hao *et al.*, 2001; Adolfosson *et al.*, 2001). Todos estos procesos son el resultado de la interacción de citocinas inductoras de la hematopoyesis como la interleucina 3 (IL-3), el

factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), de granulocitos (G-CSF), de macrófagos (M-CSF) o de acción inhibitoria como el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), o factor de crecimiento transformante (TGF) (Metcalf , 2005; Orkin *et al.*, 2008).

Una forma de medir la producción de células sanguíneas es mediante citometría hemática, de la que se toma una muestra de sangre y es analizada con un contador de células, es uno de los estudios de laboratorio más solicitados, junto con el examen general de orina y la química sanguínea, en su conjunto permiten llevar cabo diagnósticos preventivos o definidos al encontrar alteraciones particulares.

Dentro de los parámetros más analizados son la serie roja que determina diversos tipos de anemias. Para ello deben ser analizados la hemoglobina (Hb) que establece la cantidad de proteína por unidad de volumen, el hematocrito (Hct) representa la porción de eritrocitos en el total de la sangre, volumen corpuscular medio (VGM) que determina el índice eritrocítico, indicando el tamaño del eritrocito y es un parámetro empleado para el esclarecimiento de la anemia ya que permite identificar una anemia de tipo microcítica o macrocítica; hemoglobina corpuscular media (HGM) representa la cantidad promedio de hemoglobina en cada eritrocito (Ruiz, 2011). Otro parámetro importante es la serie blanca, en la que se determina el número de glóbulos blancos (GB) la cual mide dos cosas: el número total de glóbulos blancos (leucocitos) y la cuenta diferencial. La cuenta diferencial mide los porcentajes de cada tipo de leucocito. Los glóbulos blancos están compuestos de granulocitos y no granulocitos. Alteraciones en el número de GB puede indicar patologías como leucopenias (disminución del número de leucocitos) asociadas a infecciones, ingesta de medicamentos y radiaciones; o leucocitosis (aumento en el número de leucocitos) asociadas a infecciones agudas,

intoxicaciones, hemorragia aguda, padecimientos linfoma o mieloproliferativos como leucemias y necrosis tisular (Ruiz, 2011).

Con relación a la hematopoyesis extramedular, es conocido que cuando ésta se lleva a cabo, comúnmente se ve reflejada por el aumento de tamaño de los órganos hematopoyéticos secundarios como bazo, hígado y timo (Nilsson *et al.*, 1994). En este sentido se sabe que algunos productos de origen químico y natural actúan como inmunoestimulantes los cuales son administrados con el fin de conferir beneficios inmunológicos a los individuos (Yogendrasinh *et al.*, 2010). Por otro lado, también es conocido que algunos productos químicos y naturales generan efectos adversos en los órganos hematopoyéticos como puede ser: hepatotoxicidad, esplenotoxicidad, timosupresión y en casos severos involución del timo (Gruver *et al.*, 2008; Reem *et al.*, 2013). Por lo que evaluar presencia de malformaciones macroscópicas, así como diferencias de tamaño (índice esplénico, hepático y tímico) ayuda a revelar tales eventos.

El índice mitótico es otro parámetro que nos permite observar citotoxicidad *in vivo*, esta prueba además permite evaluar la relación entre el número de células que se encuentran en división y calcular la capacidad de renovación del tejido hematopoyético (Yavuz *et al.*, 2007).

En cuanto a las ENT los tratamientos que hasta ahora existen son paliativos o correctivos, estos constantemente inducen nefrotoxicidad, hematotoxicidad, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad por lo que aún sigue vigente la búsqueda de nuevas alternativas que reduzcan los efectos secundarios y eleven la calidad de vida del paciente.

2.5. LAS PLANTAS COMO ALTERNATIVA TERAPEUTICA

Durante siglos, el uso de plantas con propiedades medicinales ha sido una opción para recuperar y mantener la salud, aproximadamente el 80% de la población mundial depende de las plantas y sus componentes activos, que se aplican directamente o después de ser sintetizadas o modificadas para ejercer una óptima actividad farmacológica (Balunas *et al.*, 2005; Setzer *et al.*, 2003; Cadena *et al.*, 2013).

México ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con megadiversidad biológica y posee cerca del 10% del total de las especies conocidas, con cerca de 22,000 especies endémicas (Rzedowski, 1993). En el ámbito mundial, con respecto al número de especies de plantas, ocupa el quinto lugar, y se estiman en alrededor de 7,000 las especies con algún tipo de uso (Cuevas, 2004), se han identificado y registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial); entre 3,500 a 4,000 son empleadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar. De las cuales se ha realizado la validación química, farmacológica y biomédica de solo un 5% de las especies (CONABIO, 1998; Schlaepfer *et al.*, 2010).

2.5.1. Género *Sechium*

Una de las familias botánicas importante en la cultura mesoamericana es la familia Cucurbitaceae por la diversidad de especies integradas a la dieta y medicina (Ortega *et al.*, 1998). Dentro de esta familia se encuentra el Género *Sechium* constituido por ocho especies silvestres: *S. chinantlense* Lira & F. Chiang, *S. compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey, *S. hintonii* (Paul. G. Wilson) C. Jeffrey, *S. talamancense* (Wunderlin) C. Jeffrey,

S. panamense (Wunderlin) Lira & F. Chiang, *S. pittieri* (Cogn.) C. Jeffrey, *S. venosum* (L.D. Gómez) Lira & F. Chiang y *S. villosum* (Wunderlin) C. Jeffrey, y dos cultivadas: *Sechium tacaco* (Pittier) C. Jeffrey y *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Lira, 1996). Con distribución de México a Panamá (Cadena *et al.*, 2007).

De todas las especies la más estudiada es *Sechium edule* por su alto valor comercial y alimenticio, esta es una especie vegetal neotropical endémica de México (Lira *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2007). Es una planta herbácea y trepadora que presenta amplia variación morfológica, la cual abarca frutos carnosos de diversas formas y dimensiones (péndulo, globosos, ovoides, piriformes, oblongos, etc.) con un número variable de depresiones longitudinales, colores de epidermis (blanco, verde claro u oscuro y brillante, amarillento, etc.), grados de espinosidad (inermes a densamente espinosos), sabor (amargo, ligeramente amargo y dulce) y polimorfismo en hojas y flores (Lira *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2007). Las características anteriores han permitido establecer once grupos varietales (Cadena *et al.*, 2007; 2011; Avendaño, 2010), *S. edule* grupo varietal *albus minor*, *albus dulcis*, *albus levis*, *albus espinosum*, *nigrum minor*, *nigrum conus*, *nigrum levis*, *nigrum xalapensis*, *nigrum espinosum*, *nigrum máxima* y *virens levis* (Figura 1). Sobresaliendo que el sabor amargo sólo se conserva en las especies silvestres de *Sechium*, algunas de ellas endémicas de México, de los cuales no se tiene documentado su uso alimenticio o medicinal, aunque se ha reportado que es consumido por armadillos (Cadena, 2005).

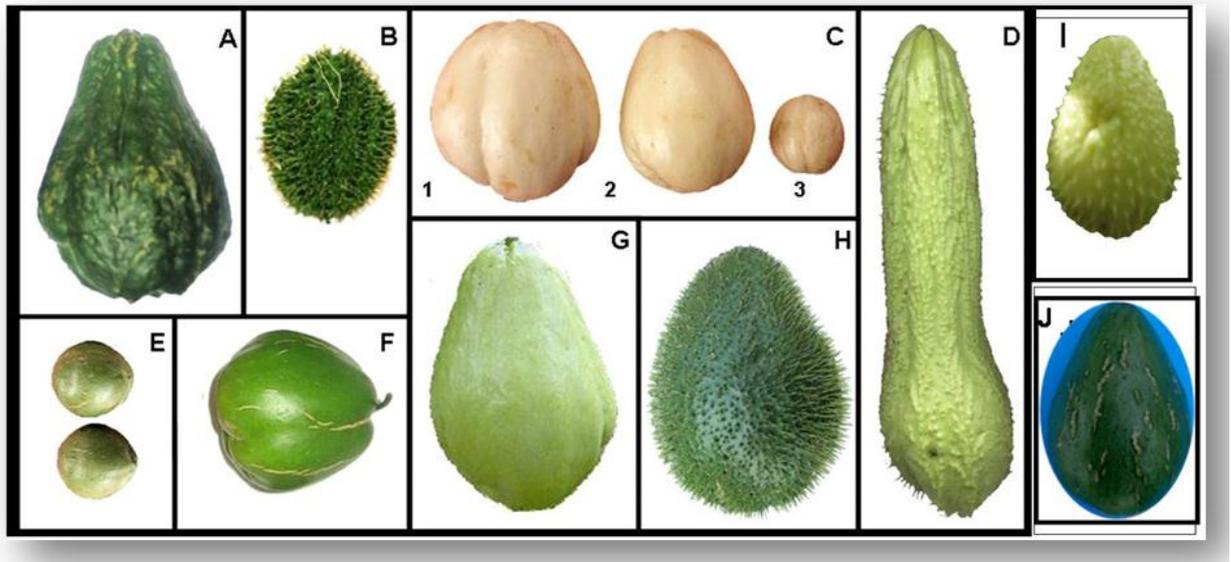


Figura 1. Grupos varietales de *Sechium edule* en México. A) *nigrum xalapensis*, B) *amarus silvestrys*, C) 1: *albus levis*, 2: *albus dulcis*, 3: *albus minor*, D) *nigrum maxima*, E) *albus minor*, F) *nigrum levis*, G) *virens levis*, H) *nigrum spinosum*, I) *albus spinosum*, J) *nigrum conus*. (Tomado y modificado de GISeM, 2008).

Entre sus usos más sobresalientes están el alimenticio y medicinal. Los frutos, hojas tiernas y raíces tuberosas de *Sechium edule* han sido y siguen siendo parte importante de la alimentación de los habitantes de Mesoamérica y de muchas otras partes del mundo.

También se utilizan en la industria para la elaboración de alimentos infantiles, jugos, salsas y pastas (Alvarenga *et al.*, 2007; Cadena *et al.*, 2007). Las partes comestibles de *Sechium edule* son relativamente bajas en fibra, proteínas y vitaminas comparadas con otros vegetales; sin embargo, éstas tienen alto contenido de calorías y carbohidratos, especialmente en tallos jóvenes, raíces y semillas, en tanto que el contenido de micro y macronutrientes del fruto es adecuado para dietas hospitalarias. Los frutos y las semillas son ricas en varios aminoácidos importantes, tales como: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, metionina (sólo el fruto), prolina, serina, tirosina, treonina y valina. (Lira, 1996; Salama *et al.*, 1986; Flores, 1989).

En cuanto al uso medicinal tradicional se ha identificado para *Sechium edulee* que el té de hojas o frutos presenta efectos diuréticos, destruye cálculos renales y se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour *et al.*, 2002). También se ha reportado el uso de chayote en el tratamiento de inflamación intestinal e inflamación cutánea y en la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003). Las propiedades diuréticas de las semillas y las propiedades cardiovasculares y antiinflamatorias de las hojas y frutos, han sido confirmadas por estudios farmacológicos (Lira, 1996). En dicho contexto se ha observado que extractos de *Sechium edule* tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-Positivas (Ordoñez *et al.*, 2003), mientras que en otros estudios *in vitro* se ha comprobado su actividad antioxidante (Ordoñez *et al.*, 2006).

En estudios realizados en ratas se observa que el extracto de *Sechium edule* tiene actividad hipotensora (Cambar *et al.*, 1980). Asimismo, se ha reportado que extractos de dicha especie tienen la capacidad de alterar el marcaje de elementos sanguíneos con el radionúclido tecnecio-99m, así como de alterar la morfología de eritrocitos, la fijación de radioactividad en las proteínas sanguíneas y la biodistribución del radiofarmacéutico pertecnetato sódico. También, se mostró que estos extractos inducen daño a la molécula de DNA, reducen los niveles de glucosa, globulina y de la presión sanguínea diastólica (Diré *et al.*, 2003; 2004; 2006). Incluso se ha mostrado que de los once grupos varietales con que cuenta *Sechium edule*, el extracto crudo etanólico de cinco variedades tienen propiedades antiproliferativas “*in vitro*” en las líneas celulares tumorales P-388, L-929 y HeLa, una leucemia macrofágica, fibrosarcoma de pulmón de ratón y cáncer cérvico uterino, respectivamente, siendo la variedad *nigrum spinosum* la de mayor

efecto antiproliferativo (Cadena *et al.*, 2007; 2013). Observaciones preliminares (no publicadas) indican que la inyección del extracto crudo del grupo varietal *nigrum spinosum* aumenta el índice mitótico en células de médula ósea de ratones normales, lo que sugiere no ser tóxico en ratones sanos.

2.5.2. Especies Silvestres

***Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang**

Denominado coloquialmente cabeza de chango, chayote cimarrón o chayote de monte, es un especie endémica de la Chinantla, región que incluye a las localidades de los municipios de Valle Nacional y San Juan Bautista Tuxtepec, en el estado de Oaxaca, Se encuentra en áreas con alta humedad y altitudes que van desde los 20 a 800 m, sin uso alimentario reconocido, por lo que los agricultores no le confieren mayor importancia, además debido a que su área de distribución está siendo fuertemente perturbada, se ubica como especie amenazada (Lira, 1996; Cadena *et al.*, 2007). La variación en color de los frutos registrada en las colectas va del verde oscuro a café-rojizo, de forma oval aplanada, tamaño pequeño, sin presencia de espinas y surcos suaves (Figura 2) (GISeM, 2008).



Figura 2. Variación de color de frutos de *Sechium chinantlense*. (Tomado y modificado de GISeM, 2008)

***Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey**

Es una especie que se distribuye en Centroamérica desde el sur del Estado de Chiapas a las zonas vecinas de Guatemala (Quetzaltenango, Escuintla y Suchitepequez). En estas zonas *S. compositum* es conocida con varios nombres comunes, la mayoría de los cuales destacan su similitud con el chayote; chayote de caballo o chayote de burro (Figura 3). No se reporta un uso alimenticio para humanos pero no se descarta ser consumido por caballos, burros y cerdos, mientras que las raíces maceradas con agua se usan como sustituto de jabón y como auxiliar contra la infestación de ectoparásitos en caballos (Cadena *et al.*, 2007).



Figura 3. Variación morfológica de frutos de *Sechium compositum* (Tipo Malpaso) registrados en diferentes poblaciones en el Soconusco, Chiapas. (Tomado y modificado de Cisneros *et al.*, 2011).

Al igual que el extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, el extracto alcohólico de frutos de las especies silvestres *Sechium compositum* y *Sechium chinantlense* tienen propiedades antiproliferativas “*in vitro*” sobre las líneas tumorales: P-388 (leucemia macrofágica), L-929 (fibrosarcoma de pulmón), J774 (leucemia macrofágica) Hela (cáncer cérvico uterino) y WEHI-3 (leucemia mielomonocítica) (Tiburcio, 2011; Rivera, 2011; Aguiñiga, 2013). Por el contrario, parece no afectar de igual forma a las células normales de médula ósea de ratón, existiendo efecto diferencial en la muerte por apoptosis en células tumorales y células normales de médula ósea (Aguiñiga, 2013; Cadena, 2013), sugiriendo cierta selectividad a las células tumorales, pero no así a las células normales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En *Sechium edule* se han reportado diversos usos: hipoglucemiante, antihipertensivo, antioxidante, antimicrobiano, además se ha mostrado que el extracto alcohólico de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, inhibe la proliferación de las líneas tumorales P-388, L-929 y HeLa. Mientras que las especies silvestres *Sechium chinantlense* y *Sechium compositum* presentan actividad antiproliferativa en las líneas tumorales P-388, J-774, HeLa, L-929 y WEHI-3, teniendo en esta última un efecto diferencial en la inducción a apoptosis con las células normales de médula ósea de ratón, pero se desconoce si las especies de *Sechium* presentan un efecto tóxico o inocuo en ratones sanos. Por lo que se pretende evaluar el efecto de extractos de diferentes especies de *Sechium* sobre las alteraciones morfométricas, bioquímicas y hematológicas, indicativas de toxicidad, en ratones sanos.

4. JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades ha tenido gran impacto en los últimos años, donde la mayor parte del conocimiento empleado deriva de la medicina tradicional, sin embargo, no en todos los ejemplares vegetales con uso terapéutico, ha sido evaluada científicamente su toxicidad y mucho menos la inocuidad, por lo que es necesario un análisis toxicológico que permita validar e incorporar las propiedades terapéuticas y efectos adversos de las plantas (Blanco *et al.*, 2006). Por otro lado se sabe que especies emparentadas taxonómicamente comparten metabolitos secundarios responsables de las actividades biológicas (Vicanco *et al.*, 2005), por ello, el género *Sechium* toma gran importancia ya que *Sechium edule* se usa, en la medicina tradicional, para tratar diversas enfermedades como: hipertensión, diabetes, cálculos renales, inflamación y cáncer, (Monroy *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2010) estas enfermedades representan un alto impacto en la mortalidad a nivel mundial. Por lo que es necesario evaluar científicamente la toxicidad de especies de *Sechium*, ya que de presentar inocuidad colocaría a las especies de *Sechium* como un potencial coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades, además de potenciar el recurso fitogénético y con ello rescatar especies silvestres que han sido subutilizadas.

5. HIPÓTESIS

En estudios *in vitro* se observó que los extractos de *Sechium* es citotóxica para células tumorales pero no en células normales de médula ósea, por lo que se espera que su administración “*in vivo*” tampoco induzca toxicidad en células y órganos de individuos sanos.

6. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar alteraciones morfométricas, bioquímicas y hematológicas, indicativas de toxicidad, en ratones sanos tratados con extracto metanólico de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum* y *S. chinantlense*.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium*, inducen alteraciones hepáticas, mediante concentraciones plasmáticas de AST, ALT y bilirrubinas.
- Determinar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium*, inducen alteraciones renales, mediante concentraciones plasmáticas de urea, creatinina y ácido úrico.
- Determinar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium*, inducen alteraciones metabólicas mediante las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol y triglicéridos.
- Determinar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium*, inducen alteraciones hematológicas, mediante biometría hemática.
- Determinar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium* modifican el índice mitótico en células de médula ósea.
- Evaluar si extractos metanólicos de diferentes especies de *Sechium* inducen alteraciones morfométricas de bazo, hígado y timo.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Se colectaron frutos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum* y *S. chinantlense* en madurez hortícola (Watada *et al.*, 1984; Cadena *et al.*, 2011), en el Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGESE), GISem-CRUO-UACH. Los frutos se cortaron en trozos pequeños, se secaron a 40 °C con circulación de aire y maceraron para estandarizar el tamaño de la partícula. La muestra incluyó epidermis, espinas y semillas. Se empleó 1 kg de fruto seco los cuales se sometieron a una extracción sólido-líquido con metanol hasta agotar la muestra, colectando el extracto arrastrado por el disolvente en un matraz seguido de una evaporación a presión reducida hasta concentrar el extracto (Cadena *et al.*, 2005). Los extractos fueron pesados y disueltos en solución fisiológica (PBS), para finalmente ser esterilizados por luz UV.

7.2. TRATAMIENTO

Ratones hembra de la cepa CD-1 (n = 12) obtenidas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de 2 a 3 meses de edad, se mantuvieron con alimento y agua en condiciones *ad libitum*.

Los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal cada 48 h durante 7 días, bajo el siguiente esquema: 1) Vehículo (1 ml de PBS), 2) *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg), 3) *S. compositum* (6.6 mg/kg), 4) *S. chinantlense* sin espinas

(6.6 mg/kg), 5) extracto *S. chinantlense* con espinas (6.6 mg/kg) y 7) ARA-C (3.0 mg/kg, control positivo de agente tóxico)

7.3. COLECCIÓN DE MUESTRAS

Veinticuatro horas después de la última inyección los animales fueron anestesiados con éter, se obtuvo sangre periférica por plexo axilar, usando como anticoagulante heparina sódica, para determinar los parámetros hematológicos y bioquímicos. Una vez obtenida la sangre se sacrificó al ratón por dislocación cervical y se obtuvieron fémures, bazo, hígado y timo para evaluar índices de cada órgano.

7.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se separó el plasma por centrifugado a 2500 y 3000 rpm durante 5 min. Las concentraciones plasmáticas de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, glucosa y bilirrubinas, fueron evaluadas por técnicas colorimétricas como se indica:

7.4.1. Urea

Estuche comercial para la determinación de urea (Randox Laboratorios Ltd, Uk UR 107). Se tomaron 10 µl de plasma y se mezcló con 1 ml de RX1 (ver anexo) se leyeron a 600 nm. El método se basa en la ureasa-Berthelot modificado donde iones amonio producidos por acción enzimática, reaccionan con salicilato e hipoclorito sódico para formar un complejo verde (Patton *et al.*, 1977; Mahmoud *et al.*, 2003; Ramanathan *et al.*, 2005).

7.4.2. Creatinina

Estuche comercial para la determinación de creatinina (Randox Laboratorios CR510). Se tomaron 200 µl de plasma y se mezcló con 2 ml de RX2 (ver anexo) se leyó a la absorbancia “A1” a 490-510 nm a los 30 segundos. Exactamente después de 2 min se tomó una segunda lectura la absorbancia “A2” a la misma longitud de onda. La creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo de color amarillo, en cantidad proporcional a la concentración de creatinina (Bartels *et al.*, 1972; Mahmoud *et al.*, 2003; Ramanathan *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

7.4.3. Ácido úrico

Estuche comercial para la determinación de ácido úrico. Método enzimático colorimétrico (Randox laboratorios Ltd. UK UA 230). Se tomaron 20 ul de plasma y se mezcló con 1 ml de RX3 (ver anexo) se leyó a 520nm. El ácido úrico presente en la muestra se cataliza por la uricasa en alantoina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual a su vez oxida al ácido 3,5-dicloro-2-hiroxibencenosulfónico y la 4-aminofenasona para formar un compuesto de quinoneimina de color rojo violeta (Ramanathan *et al.*, 2005; Diré *et al.*, 2007b).

7.4.4. Colesterol

Estuche comercial para la determinación de colesterol (método enzimático de punto final) CHOD-PAP (Randox Laboratories Ltd; UK, CH 201). Se tomaron 10 µl de plasma y se mezcló con 1 ml de RX4 (ver anexo) se incubó por 5 min a 37°C y se leyó a 546 nm. El colesterol se determina colorimétricamente después de hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador es una quinoneimina formada por H₂O₂ y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa, lo que forma un compuesto rojo-violeta (Ramanathan *et al.*, 2005; Diré *et al.*, 2007b).

7.4.5. Triglicéridos

Estuche comercial para la determinación de triglicéridos Randox GPO-PAP (Randox laboratorios Ltd, UK, TR212) Se tomaron 10 µl de plasma y se mezcló con 1 ml de RX5 (ver anexo) incubando 5 min a 37°C y se leyó a 500 nm. La presencia de triglicéridos se determina colorimétricamente tras la hidrólisis enzimática con lipasas, el indicador es una quinoneimina formada por H₂O₂, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, catalizado por peroxidasa (Koditschek, 1969; Ramanathan *et al.*, 2005).

7.4.6. Glucosa

Estuche comercial para la determinación de glucosa (método de la glucosa oxidasa, Randox laboratorios Ltd, UK, GL 2614). Se tomaron 10 µl de plasma y se mezcló con 1ml de RX6 (ver anexo) incubando por 5 min a 37°C y se leyó a 500 nm. La glucosa se determina después de una oxidación enzimática en

presencia de glucosa oxidasa. El H_2O_2 formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina rojo-violeta (Ramanathan *et al.*, 2005; Diré *et al.*, 2006; Diré *et al.*, 2007a).

7.4.7. Bilirrubina total

Estuche comercial para la determinación de bilirrubina (Randox laboratorios Ltd, UK, BR 243). Se tomaron 100 μ l de muestra y se mezcla con 1 ml de RX9 (ver anexo), se incubo por 10 min protegido de la luz y se leyó a 546 nm. La bilirrubina ligada a la albumina se libera mediante un detergente. La bilirrubina total reacciona con 2,4-dicloroanilina para formar una azobilirrubina de color violeta (Ramanathan *et al.*, 2005).

Las enzimas hepáticas se evaluaron por técnicas de cinética enzimática como se indica:

7.4.8. Aspartato aminotransferasa (AST)

Estuche comercial para la determinación de AST (Randox laboratorios Ltd, UK, AS 147). Se tomaron 100 μ l de plasma y se mezcló con 1 ml de RX7 (ver anexo) se leyó a 340 nm al tiempo cero y al cabo de 1, 2 y 3 min ASAT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -oxoglutarato con formación de glutamato y oxaloacetato. El oxaloacetato es reducido a malato en presencia de deshidrogenasa NADH (método cinético UV. IFCC) (IFCCSC, 1980; Ramanathan *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

7.4.9. Alanina aminotrasferasa (ALT)

Estuche comercial para la determinación de ALT (Randox laboratorios Ltd, UK, AL 1200). Se tomaron 100 μ l de plasma y se mezcló con 1 ml de RX8 (ver anexo) se leyó a 340 nm al tiempo cero y a los 1, 2 y 3 min. ALAT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -oxoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato es reducido a lactato en presencia de deshidrogenasa NADH (método cinético UV. IFCC) (IFCCSC, 1980; Ramanathan *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

7.5. BIOMETRÍA HEMÁTICA

Se evaluó en sangre periférica, el conteo de leucocitos, eritrocitos totales, la cuenta diferencial, la concentración de Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Htc), Volumen corpuscular medio (VCM) y Concentración de Hemoglobina corpuscular media (CHCM) en un equipo automatizado, siguiendo las especificaciones del fabricante Celi 86 (Ramanathan *et al.*, 2005)

7.6. ÍNDICE MITÓTICO

El índice mitótico es una técnica que permite evaluar la toxicidad *in vivo* por medio de la proliferación celular, en esta técnica se observan células que se encuentran en división celular (mitosis) (Yavuz *et al.*, 2007). Brevemente, 24 h después de inocular la última dosis de los diferentes extractos de *Sechium*, vehículo y ARA-C se inyectó por vía intraperitoneal 300 μ l de colchicina 0.1% (Sigma-Aldrich USA), transcurridas 2 h se obtuvieron ambos fémures y se arrastró la medula ósea con solución hipotónica

(KCl 0.047M), se dejó reposar 45 min en esta solución y posteriormente se fijaron con una solución de metanol/ácido acético (3:1). Finalmente se expandió el material genético sobre portaobjetos (previamente escarchados) por la técnica de goteo, las laminillas se fijaron con metanol durante 15 min, se tiñeron con colorante Giemsa (dilución 1:9) y se contaron al menos 1000 células por laminilla a un campo de 40x, para finalmente obtener el porcentaje de células en división (IM) con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{Células en división}}{\text{Células totales}} \times 100$$

7.7. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE ESPLÉNICO, HEPÁTICO Y TÍMICO

Antes del sacrificio los ratones fueron pesados y el valor fue registrado. El bazo, timo e hígado fueron extraídos y pesados para calcularan los índices respectivos, como el cociente del peso del órgano entre el peso corporal (Nilsson *et al.*, 1994).

$$\text{Índice esplénico} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del ratón}}$$

7.8. DISEÑO ESTADÍSTICO

En el presente estudio se realizaron al menos tres experimentos independientes. Después de calcular las medias descriptivas de los datos cuantitativos (media, desviación estándar), se llevó a cabo con un análisis de comparación de medias a través de la prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%, seguido de una prueba de rangos múltiples Tukey $p < 0.05$. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS.

8. RESULTADOS

Los extractos de *Sechium* no alteran el funcionamiento hepático de los ratones tratados.

Para determinar si los extractos de *Sechium* inducen daño hepático se evaluaron las concentraciones enzimáticas de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), así como la bilirrubina total en plasma de ratones tratados, los niveles adecuados de estos biomarcadores indican el buen funcionamiento del hígado. Encontrando que ningún extracto de *Sechium* afecta significativamente AST, ALT y bilirrubina, en comparación con el control, mientras que el ARA-C (Arabinosido de citocina o Citarabina) usado como agente citotóxico aumenta la AST indicando su toxicidad en el hígado (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de AST, ALT y bilirrubina total de los ratones tratados con extracto de *Sechium*.

	AST U/L	ALT U/L	BILIRRUBINA TOTAL mg/dL
Vehículo	120.67 ± 18.58	59.00 ± 8.72	0.35 ± 0.12
<i>S. edule</i>	128.33 ± 16.74	59.67 ± 13.50	0.39 ± 0.13
<i>S. compositum</i>	169.00 ± 12.17	56.67 ± 4.62	0.36 ± 0.11
<i>S. chinantlense s/e</i>	138.67 ± 14.22	60.00 ± 3.61	0.34 ± 0.06
<i>S. chinantlense c/e</i>	119.50 ± 7.78	59.00 ± 7.21	0.20 ± 0.03
ARA-C	248.00* ± 30.81	58.00 ± 3.00	0.23 ± 0.06

AST= Aspartato aminotransferasa, ALT= Alanina aminotransferasa, Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/ kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/ kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios ± desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* no causan daño en el funcionamiento renal de los ratones tratados.

Con el fin de determinar si los extractos de *Sechium* inducen daño renal en ratones sanos, se evaluaron las concentraciones de urea, creatinina y ácido úrico en plasma de ratones tratados, las concentraciones elevadas de estos biomarcadores de desecho, son indicadores de mal funcionamiento renal. Se observó que ningún extracto de *Sechium* eleva significativamente las concentraciones de dichos biomarcadores, en comparación con el vehículo, mientras que el ARA-C usado como agente citotóxico aumenta el ácido úrico, metabolito indicador de insuficiencia renal (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones plasmáticas de urea, creatinina y ácido úrico de los ratones tratados con extractos de *Sechium*.

	Urea mg/dL	Creatinina mg/dL	Ácido úrico mg/dL
Vehículo	47.66 ± 6.70	0.50 ± 0.15	1.8 ± 0.88
<i>S. edule</i>	45.81 ± 5.88	0.48 ± 0.14	2.1 ± 0.71
<i>S. compositum</i>	52.15 ± 8.91	0.47 ± 0.15	2.9 ± 1.33
<i>S. chinantlense s/e</i>	53.22 ± 7.42	0.44 ± 0.14	2.7 ± 0.93
<i>S. chinantlense c/e</i>	53.37 ± 9.54	0.43 ± 0.14	2.8 ± 1.07
ARA-C	44.80 ± 2.07	0.56 ± 0.17	3.7* ± 0.65

Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios ± desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo **p* <0.05 en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* disminuyen las concentraciones plasmáticas de glucosa

Para evaluar si los extractos de *Sechium* alteraban el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol y triglicéridos. Los resultados muestran que los extractos de *Sechium* disminuyen significativamente las concentraciones plasmáticas de glucosa con respecto al vehículo, siendo el extracto de *S. chinantlense* c/e el que reduce en mayor medida la glucosa en sangre, mientras que ARA-C no presentó alteraciones significativas (Figura 4).

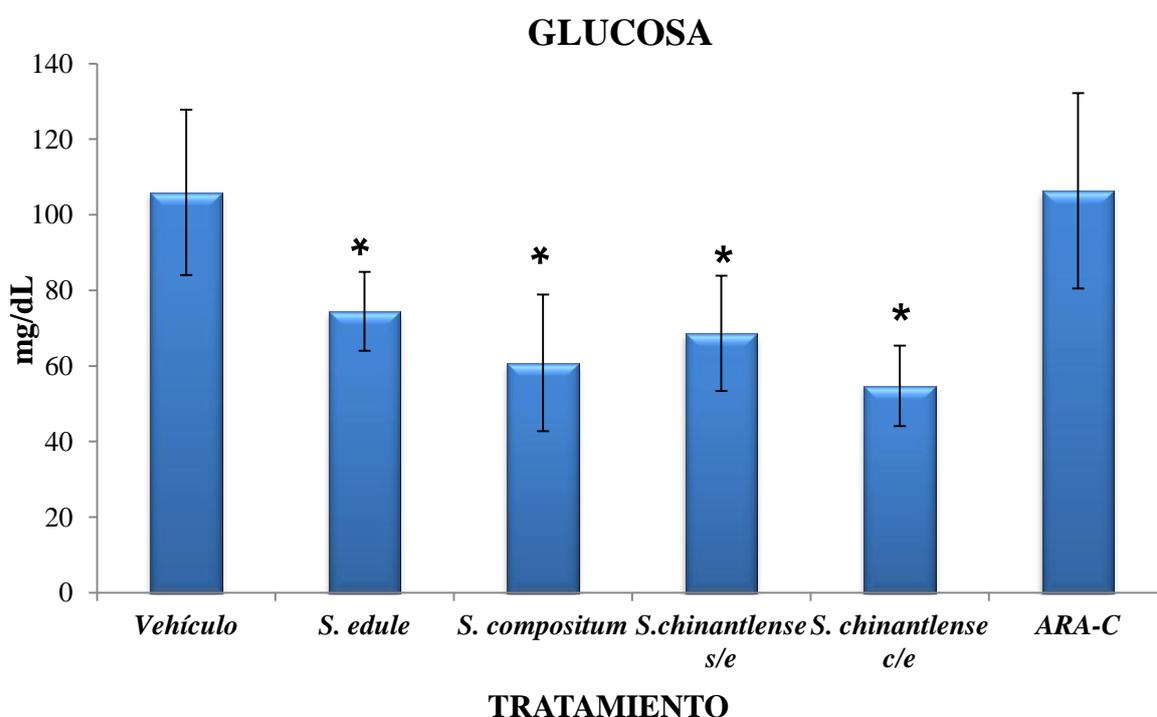


Figura 4. Grafica de concentraciones plasmáticas de glucosa de ratones tratados con extracto de *Sechium*. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios \pm desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* no alteran las concentraciones de colesterol y solo *S. compositum* y *S. chinantlesense* s/e aumenta los niveles de triglicéridos.

En cuanto a la concentración de triglicéridos, sólo se observó aumento significativo en los extractos de *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e, con respecto al control, mientras que ningún extracto indujo alteraciones en las concentraciones plasmáticas de colesterol, al igual que ARA-C (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos de ratones tratados con extractos de *Sechium*.

	Colesterol mg/dL	Triglicéridos mg/dL
Vehículo	69.73 ± 13.40	79.27 ± 16.19
<i>S. edule</i>	66.07 ± 13.57	88.87 ± 13.57
<i>S. compositum</i>	66.47 ± 11.56	100.73* ± 19.63
<i>S. chinantlense</i> s/e	66.67 ± 9.67	101.47* ± 16.18
<i>S. chinantlense</i> c/e	69.33 ± 11.25	98.20 ± 20.03
ARA-C	68.91 ± 10.92	86.60 ± 22.86

Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios ± desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* no afectan los valores eritrocitarios, pero si aumentan el número glóbulos blancos de manera diferencial en sangre periférica.

Al realizar la biometría hemática en sangre periférica de ratones tratados se encontró que el conteo de glóbulos rojos no se ve afectado por ningún extracto de *Sechium* de igual forma que el Ara-C, usado como control (Figura 5)

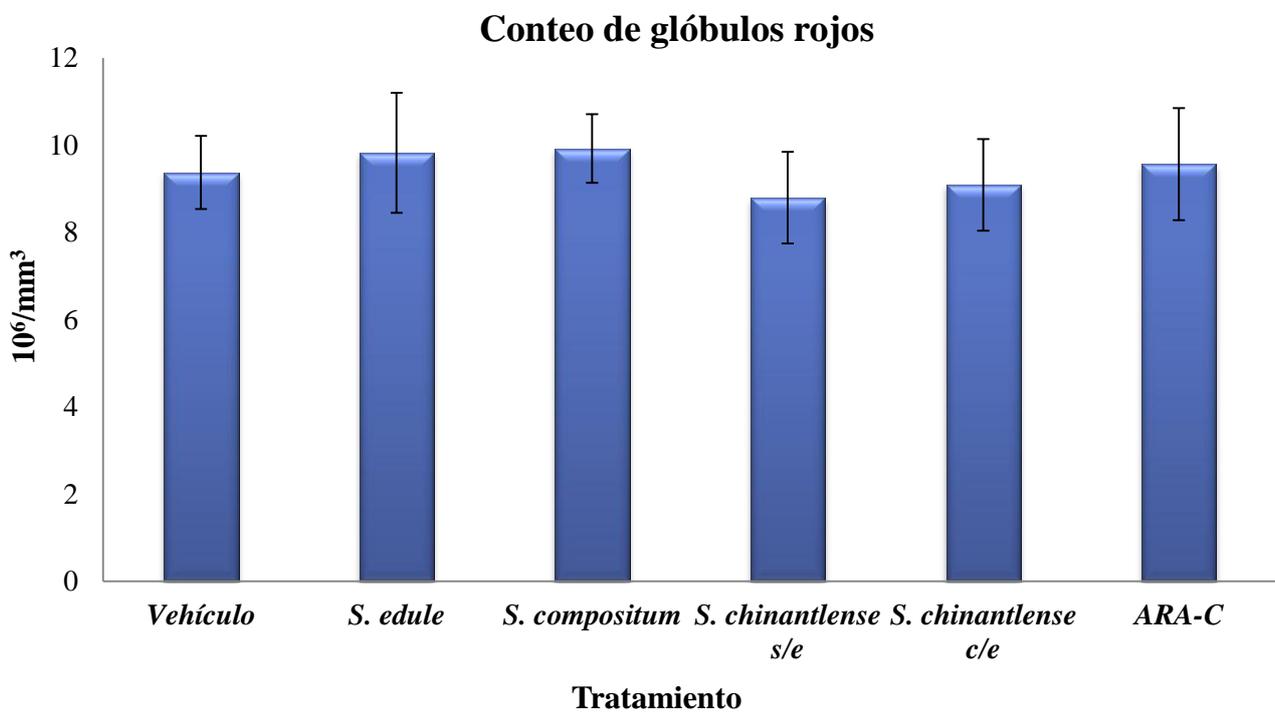


Figura 5. Conteo total de eritrocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de *Sechium*. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios \pm desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

En cuanto a los parámetros eritrocitarios como hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), concentración de hemoglobina corpuscular media (HCMC), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), se encontró que ningún extracto de *Sechium* afecta dichos valores en comparación con el vehículo (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Parámetros hematológicos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de *Sechium*.

	Hb g/dL	Hct %	HCMC g/dL
Vehículo	13.88 ± 1.37	47.79 ± 5.44	31.43 ± 1.79
<i>S. edule</i>	14.88 ± 1.03	49.07 ± 4.55	32.70 ± 2.17
<i>S. compositum</i>	15.18 ± 1.44	49.01 ± 4.77	33.26 ± 2.20
<i>S. chinantlense s/e</i>	15.39 ± 1.47	47.39 ± 5.51	32.39 ± 2.27
<i>S. chinantlense c/e</i>	15.39 ± 1.06	45.94 ± 6.15	33.19 ± 2.08
ARA-C	16.05 ± 0.79	50.09 ± 6.16	29.35 ± 2.89

Hb= Hemoglobina, Hct= Hematocrito, HCMC= Concentración de hemoglobina corpuscular media. Vehículo (1 mL de P.B.S.), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/1 kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/1 kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/1 kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/1 kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/1 kg de peso). Los datos presentados son promedios ± desviación estándar.

Tabla 5. Parámetros hematológicos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de *Sechium*.

	VCM mm ³	HCM pg
Vehículo	51.39 ± 3.18	16.34 ± 1.19
<i>S. edule</i>	51.16 ± 3.34	16.10 ± 1.45
<i>S. compositum</i>	49.83 ± 2.60	16.25 ± 0.87
<i>S. chinantlense s/e</i>	51.79 ± 3.87	16.78 ± 0.87
<i>S. chinantlense c/e</i>	50.70 ± 3.12	16.40 ± 1.06
ARA-C	53.56 ± 3.47	15.84 ± 1.71

VCM= Volumen corpuscular medio, HCM= Hemoglobina corpuscular media. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios ± desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo **p* <0.05 en el ANOVA-Tukey.

Al analizar el conteo de glóbulos blancos en sangre periférica de ratones tratados, se observó que los extractos de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e inducen aumento de glóbulos blancos totales, siendo significativo sólo para todos ellos, mientras que *Sechium chinantlense* c/e se mantiene en los mismos valores que el control, al igual que ARAa-C (Figura 6).

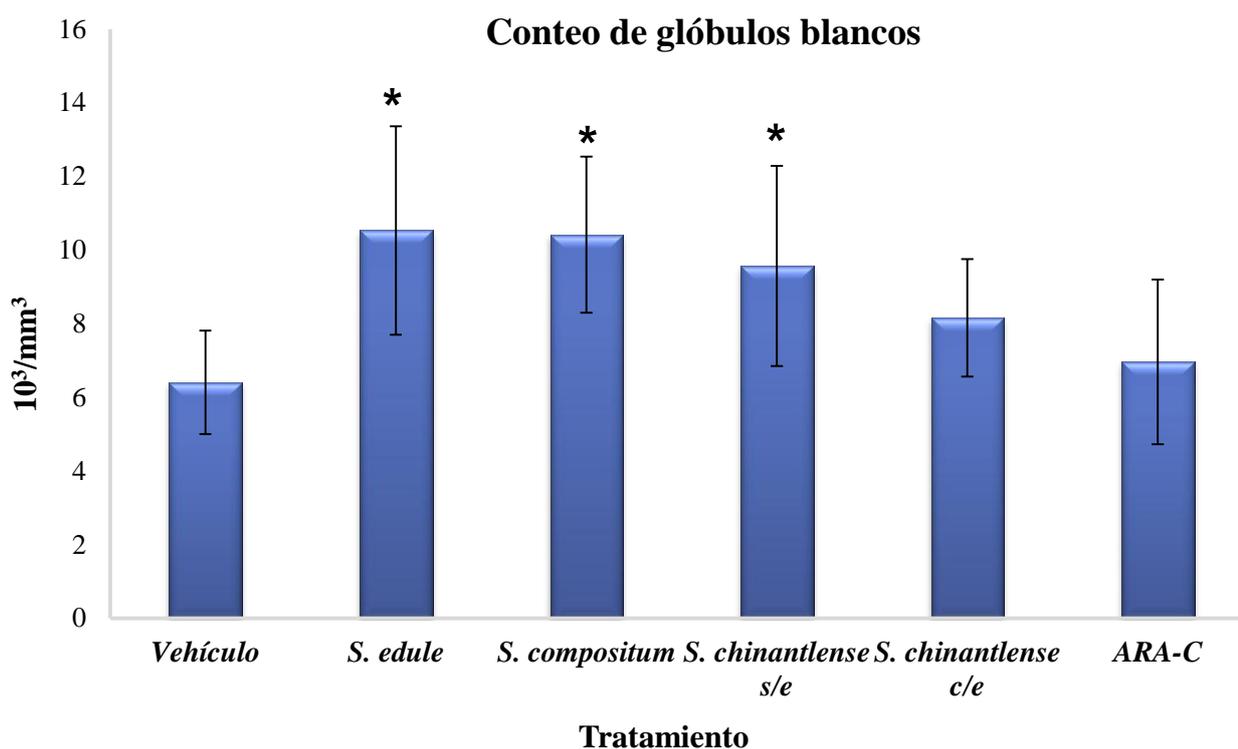


Figura 6. Conteo total de leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de *Sechium*. Vehículo (1 mL de P.B.S.), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/1 kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/1 kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/1 kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/1 kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/1 kg de peso). Los datos presentados son promedios \pm desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

En el conteo diferencial de sangre periférica de ratones tratados con los extractos de *Sechium*, se observó aumento en el número de linfocitos totales, siendo significativo para todos los extractos de *Sechium* comparado con el vehículo, en cuanto a los monocitos solo el extracto de *S. compositum* mostró aumento significativo y los extractos de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e presentaron aumento significativo en granulocitos (Figura 7).

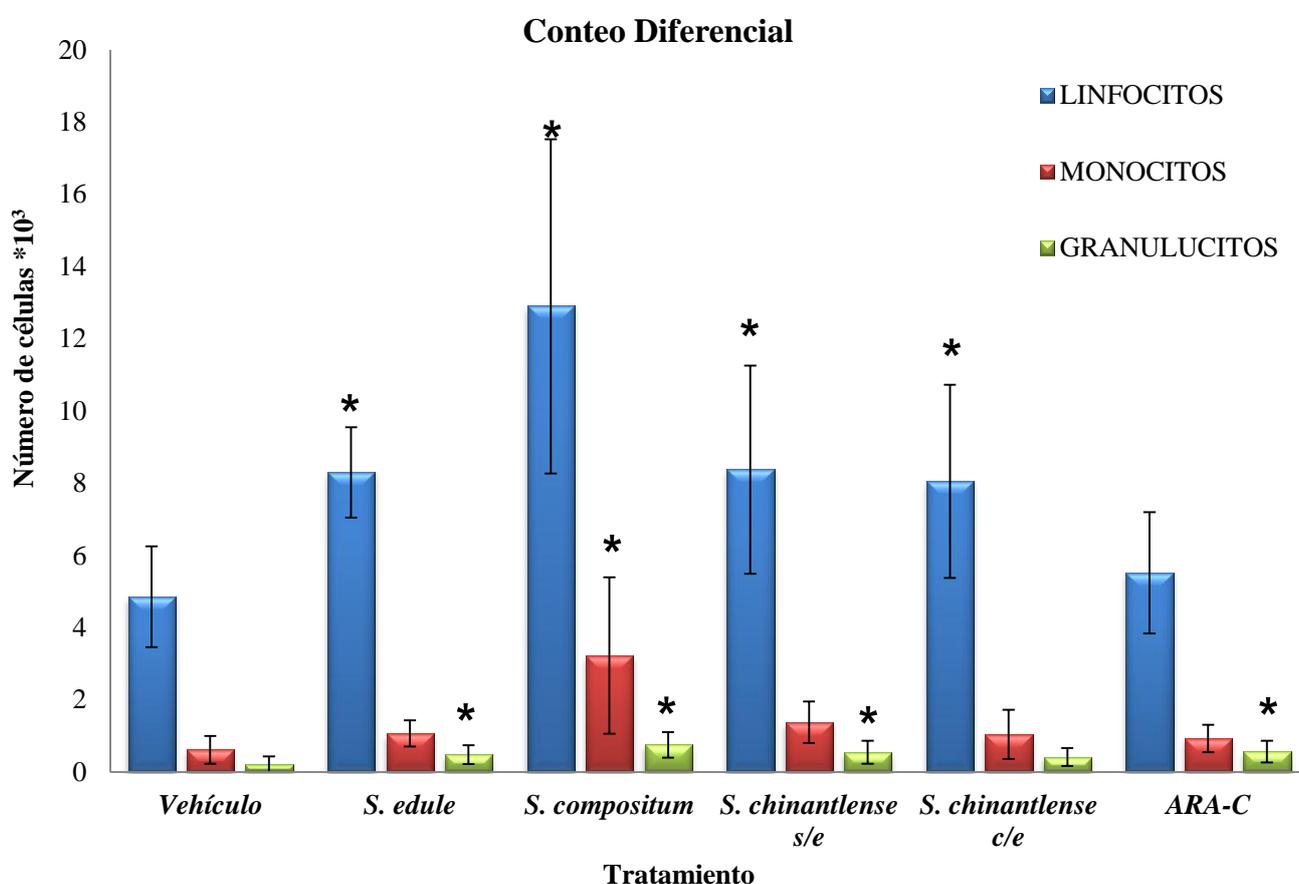


Figura 7. Conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con extractos de *Sechium* Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios \pm desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* aumentan el número de células en división en la médula ósea de ratones sanos.

Al evaluar la citotoxicidad en médula ósea de ratones tratados con los extractos de *Sechium* encontramos que todos los extractos aumentan de manera significativa el número de células en división, determinado como el índice mitótico, siendo los extractos de *S. chinantlense* los que presentan mayor aumento con respecto al control, por el contrario Ara-C disminuye significativamente el número de células en división (Figura 8).

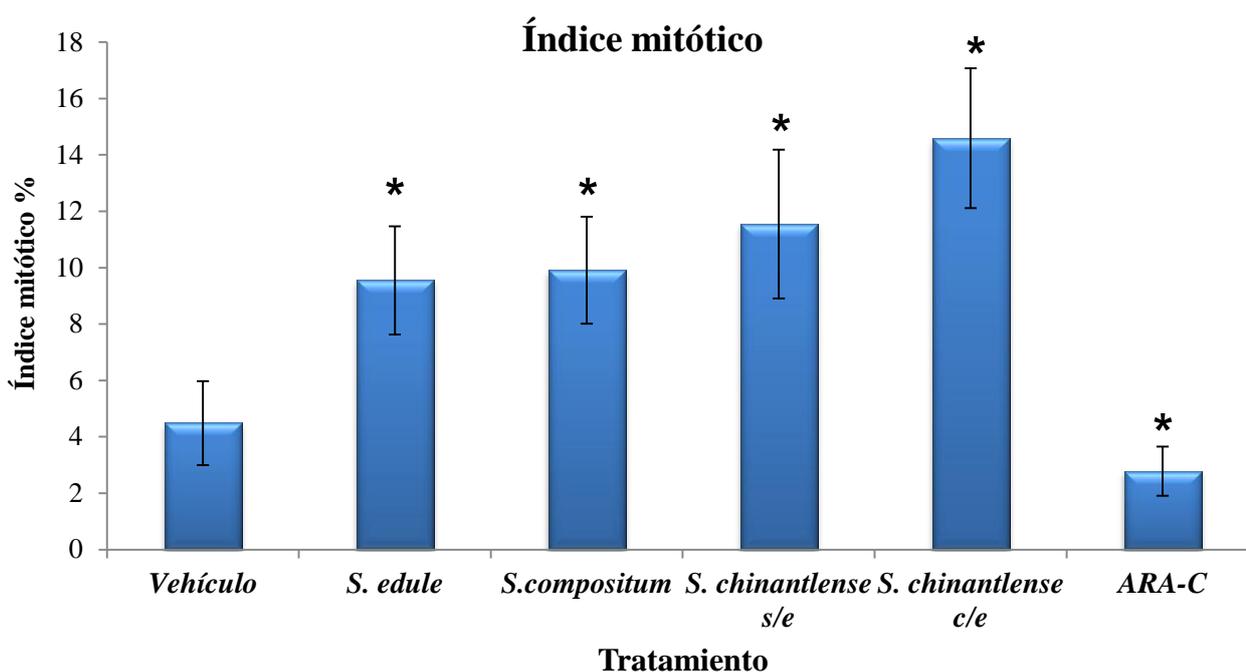


Figura 8. Índice mitótico de células de médula ósea de ratones tratados con extractos de *Sechium*. Vehículo (Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso). Los datos presentados son promedios \pm desviación estándar La diferencia es significativa con respecto al vehículo * $p < 0.05$ en el ANOVA-Tukey.

Los extractos de *Sechium* no causan alteraciones morfométricas en órganos como bazo, hígado y timo.

Con la finalidad de evaluar si los extractos de *Sechium* causan alteraciones toxicas en órganos, después del tratamiento a los ratones se les extrajo bazo, hígado y timo, encontrando que no se observaron alteraciones en el peso (tamaño), color y forma de los órganos de los ratones tratados con los extractos *Sechium* en comparación con el vehículo (Figura 9,10 y 11).

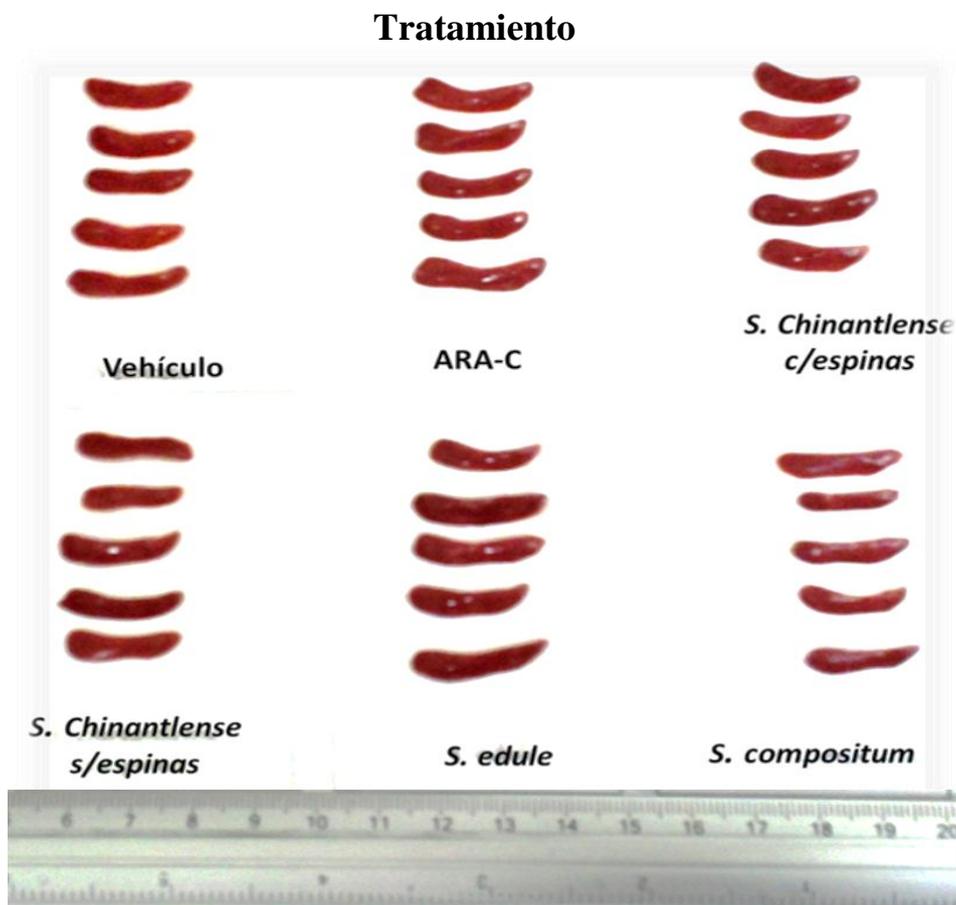


Figura 9. Bazo de ratones tratados con extractos de *Sechium*. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso).

Tratamiento

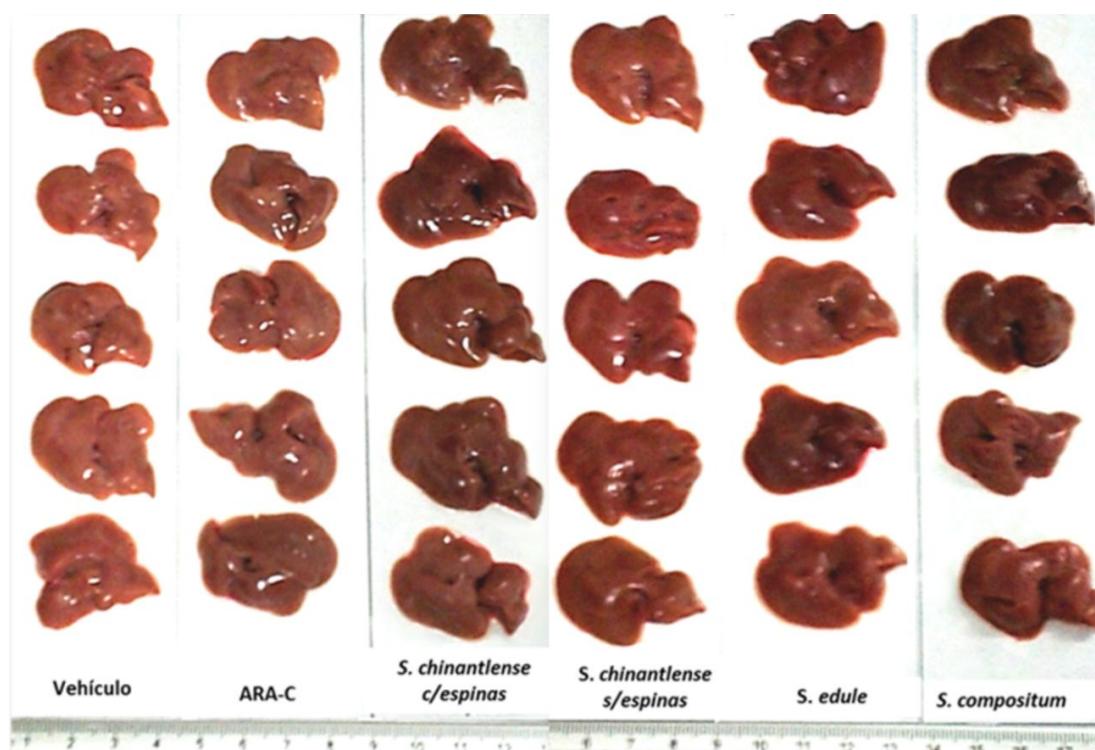


Figura 10. Hígado de ratones tratados con extractos de *Secchium*. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso).

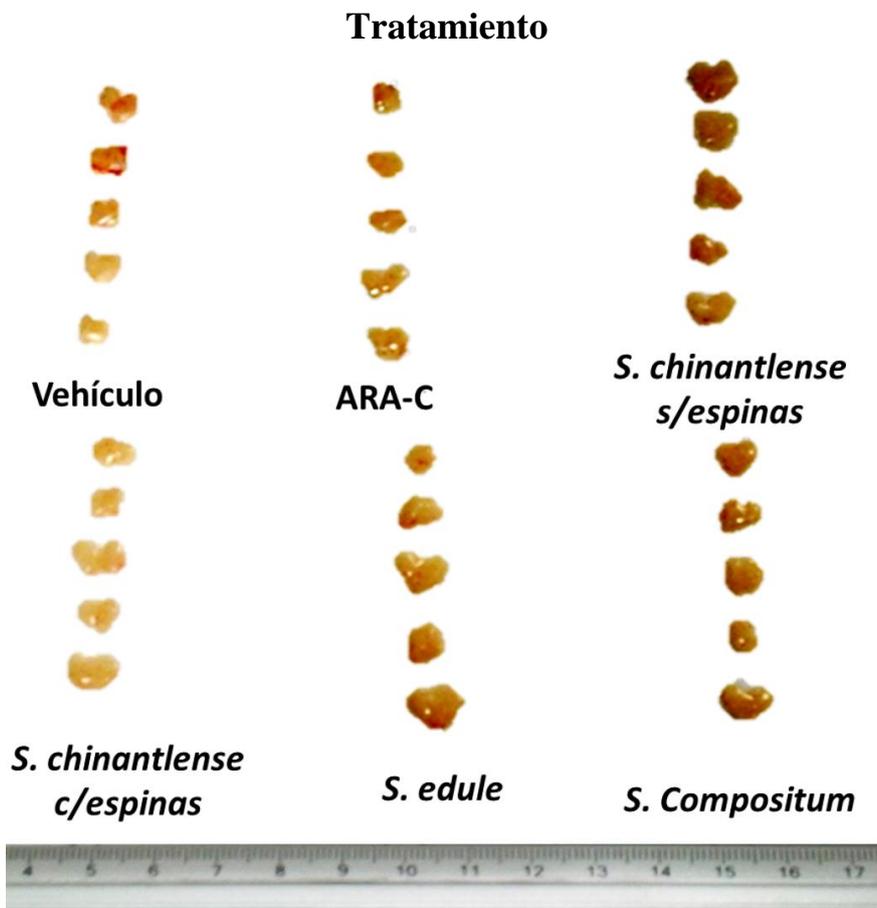


Figura 11. Timo de ratones tratados con extractos de *Sechium*. Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varital *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense* s/e (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense* c/e (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso).

Para corroborar que los órganos de los ratones tratados no aumentaron de peso, se realizó el cálculo de índice esplénico, hepático y tímico, el cual es el producto de la división del peso del órgano entre el peso del ratón. Los resultados indicaron que no hay aumento en el índice esplénico, hepático y tímico de los ratones tratados con extractos de *Sechium* en comparación con el vehículo (Tabla 6).

Tabla 6. Índice esplénico, hepático y tímico de ratones tratados con extractos de *Sechium*.

	I. ESPLÉNICO		I. HEPÁTICO		I. TÍMICO	
Vehículo	0.0048	± 0.0001	0.0672	± 0.0019	0.0013	± 0.0001
<i>S. edule</i>	0.0057	± 0.0003	0.0689	± 0.0015	0.0012	± 0.0000
<i>S. compositum</i>	0.0056	± 0.0002	0.0695	± 0.0015	0.0013	± 0.0000
<i>S. chinantlense s/e</i>	0.0053	± 0.0002	0.0683	± 0.0012	0.0014	± 0.0001
<i>S. chinantlense c/e</i>	0.0051	± 0.0002	0.0692	± 0.0017	0.0011	± 0.0000
ARA-C	0.0039	± 0.0002	0.0629	± 0.0010	0.0009	± 0.0001

Vehículo (1 mL de PBS), *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* (785 mg/kg de peso), *S. compositum* (6.6mg/kg de peso), *S. chinantlense s/e* (6.6 mg/kg de peso), *S. chinantlense c/e* (6.6 mg/kg de peso), y ARA-C (3.0 mg/kg de peso).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En México cerca del 90% de la población practica el uso de plantas medicinales como tratamiento empírico de varias enfermedades (Taddei *et al.*, 1999). Este conocimiento popular está basado en la eficacia, es decir, se acepta y adopta lo que se ve que sirve, sin embargo, un problema de la fitoterapia popular es la dificultad de llevar un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo cual puede propiciar riesgos y daños a la salud (Schlaepfer *et al.*, 2010). Aunado a esto los datos resultantes de ensayos científicos destinados a evaluar la seguridad y eficacia de los productos y las prácticas de la medicina tradicional son escasos.

Sechium edule se emplea en la medicina tradicional como diurético, cardiovascular, antiinflamatorio, contra calcificaciones renales y arteriosclerosis (Jensen *et al.*, 1986). Contiene alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroles, triterpenos (Salama *et al.*, 1986) y flavonoides glicosilados (Siciliano *et al.*, 2004) que le confieren propiedades antiinflamatorias (Salama *et al.*, 1987); antihipertensivas (Gordon *et al.*, 2000); antimicrobianas (Ordoñez *et al.*, 2003); antioxidantes (Ordoñez *et al.*, 2006), antitumorales (Rivera, 2011; Tiburcio, 2011; Cadena *et al.*, 2013; Aguiñiga, 2013) y hepatoprotectoras (Firdous *et al.*, 2012) validadas con estudios farmacológicos, sin embargo, a pesar del potencial que puede tener este recurso para el tratamiento de diversas enfermedades, no se han realizado estudios de toxicidad en modelos *in vivo*.

Bajo nuestras condiciones experimentales, se midieron las concentraciones plasmáticas de AST, ALT, colesterol y bilirrubinas, estas enzimas y biomoléculas no mostraron alteraciones por la administración de extractos de *Sechium* durante 6 días lo que indica que no generaron daño al hígado, por el contrario ARA-C control positivo de toxicidad si mostro diferencias significativas lo que corrobora que este antineoplásico de uso común genera hepatotoxicidad (Tabla 1), lo cual correlaciona con el Formulario Nacional de Medicamentos.

Es conocido que el aumento de las concentraciones séricas o plasmáticas de creatinina y urea (metabolitos de desecho de proteínas que en su mayoría cerca del 70% son filtrados por los riñones) indica toxicidad renal (Jesse *et al.*, 1982). Las concentraciones de urea y creatinina no mostraron alteraciones después de la administración de extractos de *Sechium* (Tabla 2) lo que indica que los extractos de chayote no inducen nefrotoxicidad.

La literatura reporta que *Sechium edule* disminuye la concentración de glucosa en sangre (Dire *et al.*, 2006; 2007a) nuestros resultados corroboran el efecto hipoglucemiante de *S. edule*, y aportan que el tratamiento durante 7 días de extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum*, *S. chinantlense* s/e, *S. chinantlense* c/e disminuyen la concentración plasmática de glucosa en ratones sanos (Figura 4), y solo *S. compositum*, *S. chinantlense* s/e elevan en forma significativa la concentración de triglicéridos (Tabla 3). Lo anterior se puede deber a que los aminoácidos estimulan la secreción de insulina, los principales estimuladores son lisina y arginina ambos aminoácidos están presentes en la composición nutracéutica *Sechium*

(Flores *et al.*, 1989). La insulina hace que las células pasen de utilizar ácidos grasos a carbohidratos y viceversa, lo que controla dichos cambios es la concentración de glucosa plasmática. Por lo tanto si aumenta la glucosa, aumenta la secreción de insulina y el metabolismo celular utiliza carbohidratos, si disminuye la glucosa, disminuye la secreción de insulina y el metabolismo celular utiliza ácidos grasos. Por otra parte se sabe también que la insulina aumenta la formación de proteínas (Olivares *et al.*, 2008), debido a que el ácido úrico es el producto de desecho de estas, el aumento de este metabolito sugiere que, los aminoácidos presentes en *Sechium* estimulan la secreción de insulina, que aumenta la formación de proteínas, y metaboliza la glucosa plasmática presente, una vez que la glucosa disminuye, comienza el metabolismo celular de ácidos grasos que se encuentran almacenados en el hígado y son liberados al torrente sanguíneo, lo que puede explicar el ligero aumento en niveles de triglicéridos. En este sentido recientemente se demostró que la *Momordica charantia* una especie vegetal perteneciente a la misma familia que *Sechium* (Cucurbitaceae), disminuye la concentración de glucosa sérica de ratas diabéticas debido a la regeneración de las células β pancreáticas (Singh *et al.*, 2008), Por lo que sería interesante evaluar si los extractos de chayote son capaces de regenerar las células β pancreáticas, elevar las concentraciones de insulina y disminuir los niveles de glucosa en un modelo de rata diabética.

El conteo total de eritrocitos y los parámetros de fórmula roja (Hb, Hct, HCM, VCM, CHCM) observamos que no hay diferencias significativas con respecto al vehículo (Tabla 4 y 5). Además, se mostro que la inoculación de extractos de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e aumentan significativamente el número de leucocitos presentes en sangre periférica, excepto *S. chinantlense* c/e, cuya diferencia no fue significativa con respecto al vehículo

(Figura 6). De igual manera en el conteo diferencial de dichos leucocitos observamos que los linfocitos, monocitos y granulocitos aumentan de manera significativa en todos los casos (Figura 7). Recientemente muchos de los medicamentos, productos químicos, así como productos naturales se han introducido con el fin de estimular el mecanismo de defensa específico y no específico, estos productos son conocidos como inmunoestimulantes (Yogendrasinh *et al.*, 2010) en dichas respuestas inmunológicas participan linfocitos, monocitos y granulocitos, poblaciones celulares que se encuentran incrementadas en los ratones tratados con extractos de *Sechium*, lo cual nos indica que los extractos no son hematotóxicos por el contrario son inmunoestimulantes.

El potencial inmunoestimulante de nuestro extracto también se ve reforzado por el hecho de que no inhiben la división celular en médula ósea (tejido hematopoyético), si no que potencia el índice mitótico en todos los casos con respecto al vehículo, no así para ARA-C control de citotoxicidad (Figura 8). La literatura tiene bien descrito que ARA-C tiene como efectos adversos depresión de la médula ósea que se manifiesta con leucopenia, principalmente granulocitopenia, trombocitopenia, anemia y megaloblastosis (Verstappen *et al.*, 2003; Formulario Nacional de Medicamentos), lo cual se corrobora en este trabajo. Además el índice esplénico, hepático y tímico (órganos hematopoyéticos secundarios) no son modificados y tampoco se observan lesiones o tejido adicional en ninguno de los casos (Figura 9, 10 y 11), por lo que este grupo de datos sugieren que los extractos de *Sechium* podrían actuar como inmunoestimuladores y ayudar para diversos tratamientos como el cáncer ya que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos son asociados con toxicidad no específica. Ejemplo de ello es el cisplatino que con frecuencia demuestra significativa nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (Eun *et al.*, 2009), Doxorubicina induce cardiotoxicidad, Amiodarone induce toxicidad pulmonar (Ray *et al.*, 2000).

El hecho de que los extractos de *Sechium* no son tóxicos *in vivo*, tiene relevancia si se considera que el uso de hierbas medicinales se ha ido incrementando en todo el mundo, debido a la percepción de que los productos naturales de origen vegetal son más seguros y libres de efectos secundarios que los medicamentos (Laliberté *et al.*, 1996), sin embargo estos productos naturales también tienen el potencial de causar envenenamiento a humanos, esto se debe a que todas las plantas producen una gran cantidad de compuestos (metabolitos secundarios) en defensa contra la invasión de microorganismos y virus así como de herbívoros (Wink *et al.*, 2008). Ejemplo de ello son los glucosidos triterpenicos presentes en *Actea rasemosa* también conocida como “cohohs”, sus raíces son utilizadas en la medicina alternativa para el alivio de los síntomas de la menopausia, reumatismo, dismenorrea y síndrome premenstrual, los constituyentes tóxicos de esta especie (glucósidos triterpenicos) generan necrosis hepática (Whiting *et al.*, 2002; Levitsky *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2004; Frazier *et al.*, 2009). *Atractylis gummifera* también conocida como “cardo azul”, la raíz es comúnmente utilizada como antipirético, diurético, emético y purgante, los principales componentes tóxicos de esta planta son dos glucósidos diterpenoides: atractilosida (ATR) y carboxi-atractilosida (CATR), responsables de provocar insuficiencia hepática aguda (Vallejo *et al.*, 2013; Reem *et al.*, 2013). *Callilepis laureola* también conocida como “impila” comparte el mismo metabolito toxico (ATR), sus raíces se han utilizado tradicionalmente como un remedio para problemas estomacales, infertilidad, tos e infecciones (Mokhobo, 1976; Frazier *et al.*, 2009; Wainwright *et al.*, 1977). Estudios de caso reportan disfunción hepática, necrosis tubular renal y muerte, asociada al consumo de estas plantas (Reem *et al.*, 2013).

Otro grupo de metabolitos secundarios que generan hepatotoxicidad, son los alcaloides pirrolizidina (AP) (Hartman *et al.*, 2004) y están presentes en el género *Echinacea* la literatura reporta que *E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. purpurea* han sido utilizadas como remedio para: Infecciones respiratorias, fiebre, como tratamiento de resfriado común y como un estimulante inmunológico (Goldhaber *et al.*, 1999; O'Hara *et al.*, 1998; Bye *et al.*, 1991, Kocaman *et al.*, 2008). Por último también se ha reportado que todo el género *Senecio*, contiene (AP), Algunas especies tienen uso medicinal entre ellas esta *S. latifolius* del cual se prepara una pasta de las hojas que es utilizada para heridas y quemaduras (Hutchings, 1989), *S. bicolor* que es usado como gotas oftálmicas para el tratamiento de conjuntivitis y cataratas (Dharmananda, 2001), *S. argunensis* y *S. integrifolius* que son utilizados en el tratamiento de fiebre, inflamación, diarrea y cataratas (Zhao *et al.*, 1998), el consumo de estas especies está asociado con lesión hepática (Neuman *et al.*, 2009; Reem *et al.*, 2013).

Por todo lo anterior, es claro que la administración de extractos de *Sechium* no induce toxicidad en ratones sanos, por lo que se perfila como un agente natural que puede ser utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades sin alteraciones fisiológicas que comprometan la vida del individuo.

10. CONCLUSIONES

- Los extractos de *Sechium* no alteran las concentraciones plasmáticas de AST, ALT y bilirrubina asociados a daño hepático.
- Los extractos de *Sechium* no alteran las concentraciones plasmáticas de urea, creatinina y ácido úrico asociados a daño renal.
- Los extractos de *Sechium* reducen las concentraciones de glucosa plasmática.
- Los extractos extractos de *Sechium* no alteran los niveles plasmáticos de colesterol.
- *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e aumentan los niveles plasmáticos de triglicéridos.
- Los extractos de *Sechium* no alteran la serie roja de los parámetros hematológicos.
- Los extractos de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* *S. compositum* y *S. chinantlense* s/e, aumentan el número de glóbulos blancos.
- Todos los extractos de *Sechium* aumentan el número de células en el conteo diferencial en sangre periférica.
- Los extractos de *Sechium* aumentan el índice mitótico.
- Los extractos de *Sechium* no alteran el índice esplénico, hepático y tímico.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abdelnour A., C. Ramírez., F. Engelmann. 2002. Micropropagación del chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía Mesoamericana*. 13: 147-151.
- ADA (American Diabetes Association). 2010. Position statement. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care journals*. 33:S62-S69.
- Adolffonsson J., O. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard, I. Astrand, E. Sitnocka, Y. Sasaki, S. Jacobsen. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-Kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15: 659-669.
- Aguiñiga I. 2013. Potencial antileucémico in vitro de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- AHA (American Heart Association). 1997. Phytochemicals and Cardiovascular Disease. Disponible en: <http://circ.ahajournals.org/content/95/11/2591.full#cite-by>
- Alonso A., M. Villarreal, L. Salazar, M. Gomez, F. Dominguez, A. Garcia. 2010. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, Phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 945-972.
- Alvarenga S., E. Abdelnour, V. Villalobos. 2007. Conservación In vitro de chayote (*Sechium edule*). *Agronomía Mesoamericana*. 18: 65-73.
- Álvarez H., Pérez E. 2005. El paciente con hipertransaminasemia. *Revista Facultad de Medicina de la UNAM*. 48: 58-65.
- Arredondo A., De Icaza E. 2011. Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del caso Mexicano. *Value in Health*. 14: S85-S88.
- Avendaño C., J Cadena, L Arévalo, R Campos, V Cisneros, J Aguirre. 2010. Las variedades del chayote mexicano, recurso ancestral con potencial de comercialización. *GISeM*. México. 88.

- Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and Cellular Biochemistry* 182:31-48.
- Balunas J., Kinghorn A. 2005. Drug discovery from medicinal plants, *life Sciences*. 78: 431-441.
- Bartels H, Böhmer M, Heierli C. 1972. Serum Kreatinib-estimmung ohne Enteiweissen. *Clinical Chemistry*. 37:193–197
- Baynes J., Dominizac M. 2004a *Bioquímica Médica. Lípidos y Lipoproteínas*. 2ª ed. Elsevier España.229-245.
- Baynes J., Dominizac M. 2004b *Bioquímica Médica. Metabolismo oxidativo de los lípidos en el hígado*. 2ª ed. Elsevier España.193-198.
- Baynes J, Dominizac M. Jones A. 2004c. *Bioquímica Médica. Funciones específicas del hígado*. 2ª ed. Elsevier España. 405-416.
- Bermúdez A. 2003. Los ácidos grasos w-3 y w-6 y su efecto sobre la salud. *Lípidos y Salud* 4:1-4.
- Bishop M. 2006. *Química clínica principios procedimientos y correlaciones*. México. Mc Graw Hill-Interamericana.
- Blanco N., A Ramos, A Vizoso. 2006. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 11: 1-7
- Bodenheimer T., E Wagner, K Grumbach. 2002. Improving primary care for patients with chronic illness. *The Journal of the America Medical Aassociation*. 288:1775-1779
- Bye S., Dutton M. 1991. The inappropriate use of traditional medicines in 451 South Africa. *Jouernal Ethnopharmacology*. 34: 253–259.
- Cadena J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. México.
- Cadena J., C Avendaño, M Soto, L Ruiz, J Aguirre, L Arévalo, E Santiago, M Acosta, V Cisneros, D Ochoa. 2007. Production, genetics, postharvest

management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. In: Fresh Produce. Teixeira da Silva, J. (ed). Glob. Sci. Books.1:41-53.

- Cadena J., Arevalo L. 2011. Las variedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su comercio mundial. México. Editorial Colegio de Postgraduados. 15-58.
- Cadena J., L Arévalo, L Ruiz, J Aguirre, M Soto, M Luna, H Zavaleta. 2006. Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* (Jacq.) Sw. fruit during postharvest. *Postharvest Biology and Technology*. 40: 170-176.
- Cadena J., M Soto, A Torres, I Aguiñiga, L Ruiz, A Rivera, C Avendaño, E Santiago. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumor cell lines. *Journal of Medical plant Research* 7: 455-460
- Cadena J., M Soto, L Ruiz, E Santiago, G Campos, V Barriga, A Torres. 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 Z. 2013. Inducción de la fragmentación del DNA en las líneas celulares leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- Cisneros V., Cadena J, Avendaño C, Arevalo L. 2011. El Chayote. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México, A.C. 2:8.
- Cambar P., P Portillo, E Tabora, L De Pineda, O Tovar, J Casco, C Alvarado, G Díaz, B Casco, L Cantillo. 1980. Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. *Revista Medica de Honduras*. 48:97-99.
- Cohen S., O'Connor A, Hart J, Merel N, Te H. 2004. Autoimmune hepatitis associated with the use of black cohosh: a case study. *Menopause*.11: 575-577.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y el uso de la Biodiversidad). 1998. La biodiversidad biológica de México Estudio de País. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/institucion/estudio_pais/INICIO.PDF
- Córdova J., J Barriguete, A Lara, S Barquera, M Rosas, M Hernández, M De León, C Aguilar. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: Sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*. 50: 419-427.

- Cuevas S. 2004. Ponencia impartida durante el Encuentro de Canasta de Semillas, 19 y 20 de noviembre 2004, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Dharmananda S. 2001. Safety issues affecting herbs: Pyrrolizidine alkaloids. Institute for Tradicional medicine. Disponible en: <http://www.itmonline.org/arst/passhtm>
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2000. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2012. Norma Oficial Mexicana. NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.20-49.
- Diré G, M Almeida, M Coura, S Vasconcelos, P Siqueira, R Duarte, J Rodrigues, J Oliveira, M Fernandes, F Bernardo. 2007. Effects of a chayotte (*Sechium edule*) extract (macerated) on the biochemistry of blood of Wistar rats and on the action against the stannous chloride effect. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10:823-827 **b**.
- Diré G., E Lima, M Gomes, F Bernardo. 2003. The effect of a chayote (*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 Journal of Nutrition. 2:221- 227.
- Diré G., J Rodrigues, J Oliveira, S Vasconcelos, P Siqueira, R Duarte, M Almeida, M Fernandes, F Bernardo. 2007. Biological effects of a chayotte extract in Wistar rats with induced diabetes: a radiopharmaceutically analysis. Pakistan Journal of Biological Sciences.10:568-574 **a**.
- Diré G., M Gomes, E Lima, R Jales, M Faria, F Bernard. 2004. Effect of chayotte extract on the biochemical determinations and on molecular and cellular levels. Journal of Biological Sciences. 4: 146-150.
- Diré G., S Vasconcelos, P Siqueira, M Duarte, M Almeida, J Rodrigues, F Bernardo. 2006. The analysis of the effect of a chayotte extract on the radiolabeling of blood elements in diabetic rats. Pakistan journal of nutrition, 5:269-273.

- Doñate F., Yañez A, Iriarte A, Martínez M. 2000. Interaction of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase and its presequence peptide with model membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 34147-56.
- Eun D., Young J, Jin B, Wook K, Young-Tai S, Ki-Ryang N. 2009. Pretreatment with Darbepoetin Attenuates Renal Injury in a Rat Model of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity
- Firdous S., K Sravanthi, R Debnath, K Neeraja. 2012. Protective effect of ethanolic extract and its ethylacetate and n-butanol fractions of *Sechium edule* fruits against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences*, 4:354-359.
- Flores, E. M. (1989). El chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae). *Rev. Biol. Trop.* 37(1):1-54.
- Formulario Nacional de Medicamentos. Capítulo 8. Antineoplásicos e inmunosupresores y medicamentos usados en cuidados paliativos. Disponible en: <http://www.dmsgbc.sld.cu/formulario/antineoplasicos.htm>
- Frazier T., Krueger K. 2009. Hepatotoxic herbs: will injury mechanisms guide treatment strategies. *Curr Gastroenterol Rep.* 11: 317-324.
- Fuentes X., M Castiñeiras, M Ferre. 2003. *Códex del laboratorio clínico indicaciones e interpretación de los exámenes de laboratorio*. Elsevier. España. 740.
- Ganong W., Kim B, Heddwen B, Scott B, Susan B. 2010. *Review of Medical Physiology*. 23 ed. Mc Graw Hill, Lange. 23 ed: 10-15.
- GISeM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México) 2008. *Colecta, caracterización y conservación de Sechium spp. Informe en extenso*. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos-SAGARPA. México.
- Goldhaber F., Kemper K. 1999. *Echinacea (E.angustifolia, E. pallida, and E. Purpurea)*. The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research.
- González P., D Gutiérrez, G Stevens, L Barraza, C Porras., N Carvalho. 2007. Definición de prioridades para las intervenciones de salud en el Sistema de Protección Social en Salud de México. *Salud Pública México*. 49:S37-S52.

- Gordon E., L Guppy, M Nelson. 2000. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). West Indian Medical Journal. 49: 27-31.
- Gruver A., Sempoewki G. 2008. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. Journal of Leukocyte Biology. 84: 915-923.
- Harman T., Theuring C, Beuerle T, Ernest L, Singer M. Bernais E. 2004. Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloids profile of their larval food-plants. Journal of Chemical Ecology. 30: 229-254.
- Hao Q., J. Zhu, M. Price, L, Barsky, G. Croocks. 2001. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. Blood. 97: 3685-7779.
- Hayes AW. 1989. Guidelines for acute oral toxicity testing, in: Principles and Methods of Toxicity. New York. Raven.184.
- Hutchings A., 1989. A survey and analyses of medicinal traditional plants as used by de Zulu, Zhosa and Sotho. Bothalia. 19:111-116.
- IDF (International Diabetes Federation). 2011. disponible en: <http://www.idf.org/sites/default/files/Media%20Information%20Pack.pdf>
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y GEOGRAFÍA). 2009. Estadísticas a propósito del día mundial del corazón, datos nacionales. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2010/edad10.asp?s=inegi&c=2769&ep=43>
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y GEOGRAFÍA). 2010. Mortalidad: De que mueren lo Mexicanos. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y GEOGRAFÍA). 2011. Mortalidad. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/Proyectos/registros/vitales/consulta.asp?c=11800&s=est>
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y GEOGRAFÍA). 2012. Estadística a propósito del día mundial de la diabetes. Disponible en:

<http://www.poliglodatos.com/archivos/BOLETINES/ESPECIALES/diabetes0.pdf>

- International Federation of Clinical Chemistry, Scientific. Committee. Journal. Clinical. Chemistry and Clinical Biochemistry. 1980, 18: 521-534.
- IPCS (International programme on chemical safety). 2000. IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research. 463: 111-172.
- Jensen L., Lai A. 1986. Chayote (*Sechium edule*) Causing Hipokalemia in pregnancy. Journal Obstetric Ginecology. 155: 1048-1049.
- Jesse B. 1982. Animal Anatomy and Physiology. Reston, VA: Reston.
- Kaplan M., Muraca M, Vreman H, Hammerman C, Vilei M, Rubaltelli F, Stevenson D. 1984. Bilirubin. Clinical Chemical The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1238-1241. 436 and 650.
- Karadeniz A., Nejdet L, Simsek, Karakus E, Yildirim S, AdemKara, Can I, Kisa K, Emre M, Turkeli. 2011. Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 1-10.
- Kocaman O., Hulagu S, Senturk O. 2008. Echinacea induced severe acute hepatitis with features of cholestatic autoimmune hepatitis. Journal of Internal Medicine, 2008; 19: 148-148.
- Laliberté L., Villeneuve J. 1996. Hepatitis after the use of germander, a herbal remedy. Canadian Medical Asociacion Journal. 154:1689-1692.
- Levitsky J., Alli T, Wisecarver J, Sorrell M. 2005. Fulminant liver failure associated with the use of black cohosh. Digestive Diseases and Science. 50: 538-539.
- Ling, W., Jones P. 1995. Dietary Phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences. 57:195-206.
- Lira 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. International Plant Genetic Research Institute. Italy. 58.

- Lira R., J Castrejón, S Zamudio S, C Rojas. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana*. 49:47-61.
- Liu Z, Liu J, Zhang A, Wu Q, Ruan Y, Lewith G, Visconte D. 2011. Hierbas medicinales chinas para la hipercolesterolemia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* DOI: 10.1002/14651858.CD008305
- Lyer A., S Pachal, H Poudyal, L Brown. 2009. Potential Health Benefit of Indian Spices in the symptoms of de metabolic syndrome. *Indian Journal of Chemistry & Biophysics*. 46: 467-481.
- Mahmoud A., Othman A. Al-Shabanah A. El-Khashef. 2003. L-Arginine ameliorates kidney function and urinary bladder sensitivity in experimentally-induced renal dysfunction in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 373-378.
- Neuman G., Steenkamp V. 2009. Toxicity profile of Pyrrolizidine alkaloids-containing medicinal plants: Emphasis on Senecio species. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3: 104-108.
- Mayani H., E. Flores, R. Pelayo, J.J. Montesinos, P. Flores, A. Chavez. 2007. Hematopoyesis. *Cancerología* 2:95-107.
- Metcalf D. 2005. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. *Journal Cell Physiology*. 7: 89-99.
- Mokhobo K. 1976 Herb use and necro-degenerative hepatitis. *South African Medical Journal* 50: 1096–1099.
- Monroy M., M Soto M, J Cadena J, E Santiago, L Ruiz, H Rosas. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*. 43:777-790.
- NRC (National Research council). 1992. *Biological Markers in immunotoxicology*. National academic Press, Washington DC. 9-22
- Nilsson S., Bertoncello I. 1994. Age-related with changes in extramedullary hematopoiesis un the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice. *Hematology*. 22: 377-383

- O'Hara M., Kiefer D, Farrell K, Kemper K. 1998. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Family Medicine Journal*, 7: 523-536.
- Olivares R., P Arellano. 2008. Bases Moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. 27: 9-18
- Ordoñez A., J Gómez J, M Vattuone, M Isla. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. extracts. *Food Chemistry*. 97: 452-458.
- Ordoñez A., J Gómez, N Cudmani, M Vattuone, M Isla. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Microbial Ecology in Health Disease*. 15:33-39.
- Orkin S. and Leonard. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 132: 631-644.
- Ortega R., M Martínez, G Rincón. 1998. Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de fitotecnia. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. 321.
- Palma J., 2007. Diabetes Mellitus Seen as a Cardiovascular Disease of Metabolic Origin. *Revista. Española de Cardiología Suplementos*. 8:12H19H.
- Patton C., Crouch S. 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 49; 464-469.
- Pollak O., Kritchevsky D. 1981. Sitosterol. *Monogr. Atherosclerosis Journal*. 10: 1-219.
- Ramanathan K., Malaya G, Upal M, Yerra R, Thangavel H, Periaswamy G, Rathnamala R. 2005. Effects of methanol extracts of *Caesalpinia bonducella* and *Bahaina racemosa* on hematology and hepatorenal function in mice. *Journal of Toxicological Sciences*.30:265-274.
- Ray SD., D Patel D, V Wong, D Bagchi. 2000. In vivo protection of dna damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology* 107:137-66.

- Reem J., Consolato S. 2013. Hepatotoxic Botanicals - An Evidence-based Systematic Review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 16: 376-404.
- Reichling J, Kaplan M. 1998. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 33: 1601-14.
- Rivera A. 2011. Efecto del extracto de (*S. chinantlense* (Lira y Chiang), *S. compositum* (J.D. Smith) C. Jeffrey) y un híbrido H-387-07-GISeM sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Ruiz G., 2011. Fundamentos de Hematología. 4ª ed. México. Editorial Médica Panamericana. 13-24.
- Rzedowski J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press. 129-144.
- Salama A., E Polo, C Contretras, L Maldonado. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. *Revista Colombiana Ciencias Químicas Farmacológicas*. 15:79-82.
- Salen, G., Ahrens E, Grundy S. 1979. Metabolism of (Δ)-sitosterol in man. *Journal Of Clinical Investigation*. 49:952-967.
- Santiel A., C Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Schlaepfer L., E Mendoza. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 4:18-27.
- Setzer W., Setzer M. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 3:540-556.
- Siciliano T., N De Tommas, I Morelli, A Braca. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *Journal of Agricultura Food Chemistry* 52: 6510-6515

- Siest G., Schiele F, Galteu M. 1975. Aspartate aminotransferase and aspartate alanine aminotransferase activities in plasma statistical, distributions, individuals variations, and reference values. *Clinical chemistry*. 21: 1077-81
- Singh N, Gupta M, Sirohi P, Varsha. 2008. Effects of alcoholic extract of *Momordica charantia* (Linn.) whole fruit powder on the pancreatic islets of alloxan diabetic albino rats. *Journal of Environmental Biology*. 29:101
- Taddei G., Santillana M, Romero J, Romero M. 1999. Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública México*. 41: 216-220.
- Tiburcio R. 2011. Efecto de los extractos crudos de especies silvestres de *sechium* spp. (*S. chinantlense* (Lira y Chiang) y *S. compositum* (J.D. Smith) C. Jeffrey) y un híbrido H-387-07-GISem sobre la proliferación de líneas Leucémicas Mieloides de Ratón. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Valenzuela A., Ronco A. 2004. Fitoesteroles y Fitoestanoles aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena Nutrición*. 21:161-169
- Vallejo J, Peral D, Gemio P, Carrasco M, Heinrich M, Pardo M. 2013. *Atractylis gummifera* and *Centaurea ornata* in the Province of Badajoz (Extremadura, Spain) Ethnopharmacological importance. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology* 16:376-404
- Verstappen C., Heimans J, Hoekman K, Postma J. 2003. Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management. *Drugs*. 63:1549-1563.
- Vicanco J., E Cosio E, H Loyola, H Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Investigación Ciencia*. 2:68-75.
- Wainwright J, Schonland M, Candy H. 1977. Toxicity of *Callilepis laureola*. *South African Medical Journal*. 52: 313-315
- Watada A., R Herner, A Keder, R Romani, G Staby. 1984. Terminology for description of developmental stages of horticulture crops. *Hortscience*. 19:20-21
- Whiting P., Clouston A, Kerlin P. 2002, Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Medical Journal of Australia*. 177: 440-443.
- Wink, M., Van Wyk B. 2008. *Mind-Altering and Poisonous Plants of the World*. 725

- WHO (World Health Organization). 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva. 80. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf

- WHO (World Health Organization). 2007. World Health Statistics 2007. World Health Organization. 88. Disponible en: <http://www.who.int/whosis/whostat2007.pdf>

- WHO (World Health Organization). 2009. Global Health Risks Mortality disease attributable selected major risks. World Health Organization. 62. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf

- Yavuz A., M Topaktas. 2007. In Vitro Evaluation of the Genotoxicity of Acetamidrid in Human Peripheral Blood Lymphocytes. Environmental and Molecular Mutagenesis 48:483-490.

- Yogendrasinh B., Sunita M. 2010. Immunostimulatory activities of Vigna mungo L. extract in male Sprague–Dawley rats. Journal of Immunotoxicology. 7: 213-218.

- Zhao X., Wang Z, Lin G, Cui Y, Zhang M, Xu L. 1998. hepatotoxic Pyrrolizidine alkaloids and traditional Chinese medicine, Chinese Traditional Herbal Drugs. 29: 34

12. ANEXO I

RX1. Reactivo de trabajo urea

R1a. Buffer Tris –Buffer (150 mMol/L, pH7).

R1b. Reactivo enzimático UR 456. (Ureasa 15 U/mL, GLDH 1 U/mL, NADH 0.28 mmol/l, adenosine-5-diphosphate 2.45 mMol/L y α -oxoglutarato 11.7 mMol/L).

Reconstituir un vial de reactivo enzimático (Rb1) con 15 mL de buffer (R1a), el reactivo de trabajo es estable 4 semanas en refrigeración (+2 a +8°C).

RX2. Reactivo de trabajo creatinina

R1a. Acido pícrico (35 mMol/L)

R1b. Hidróxido sódico (0.32 mMol/L)

Mezclar el R1a y R1b en proporción 1 + 1. El reactivo de trabajo es estable 3 días, conservarse entre (+15 y +25°C).

RX3. Reactivo de trabajo ácido úrico

R1a. Tampón (T. HEPES 50 mMol/L pH 7.0, 3.5 DCHBS 4.0 mMol/L)

R1b. Reactivo enzimático UA 230 (4-minofenazona 0.25 mMol/L, peroxidasa 1000 U/L y uricasa 200 U/L).

Reconstituir el contenido de un vial de reactivo enzimático (R1b) con un pequeño volumen de tampón (R1a) y transferir el contenido entero a la botella de (R1a), estable 21 días, conservar entre +2 y +8°C. Protegido de la luz.

RX4. Reactivo de trabajo colesterol

Reactivo enzimático (4-Aminoantipirina 0.30 mMol/l, fenol 6 mMol/L, peroxidasa 0.5 U/mL, colesterol esterasa 0.15 U/mL, colesterol oxidasa 0.1 U/mL y pipes buffer 80 mMol/L; pH 6.8). Conservar entre +2 - +8°C.

RX5. Reactivo de trabajo triglicéridos

R1a. Tampón (Tampón pipes 40 mMol/L, pH 7, 4-clorofenol 5. mMol/L Iones magnesio 5.0 mMol/L, ATP 1.0 mMol/L, peroxidasa 0.5 U/mL, glicerolquinasa 0.4 U/mL, glicerol-3-fosfato oxidasa 0.4 U/mL, azida sódica 0.05%).

R1b. Reactivo enzimático (4-aminoantipirina 0.4 mMol/L, lipasa 150 mMol/L, azida sódica 2.29mmol/l (200mg/dL). Reconstituir un vial de reactivo enzimático R1b Cat. TR210 con 15 mL de tampón R1a. El reactivo es estable 21 días, conservar entre +2 - +8°C.

RX6. Reactivo de trabajo glucosa

R1. Reactivo glucosa (tampón fosfatos 50 mMol/L, pH 7.0, Fenol 11 mMol/L, 4-aminofenazona 0.77 mMol/L, glucosa oxidasa 1.k U/L y peroxidasa 1.5k U/L), conservar entre +2 - +8°C.

RX7. Reactivo de trabajo aspartato aminotransferasa (AST)

R1a. Tampón/sustrato (Tampón tris 80 mMol/L, L-aspartato 240 mMol/L)

R1b. Tampón/coenzima/ α -oxoglutarato (α -oxoglutarato 12 mMol/L, MDH 420 U/l, LD 600 U/l, NADH 0.18 mMol/L).

Reconstituir un vial de tampón/coenzima/ α -oxoglutarato R1b con 2 mL de R1a tampón sustrato. El reactivo es estable 14 días, conservar entre +2 - +8°C.

RX8. Reactivo de trabajo alanina aminotrasferasa (ALAT)

R1a. Tampon/suatrato (tampón tris 100 mMol/L, pH 7.5, L-alanina 0.6 mMol/L)

R1b. Tampón/coenzima/ α -oxoglutarato (α -oxoglutarato 15 mMol/L, LD 1.2 U/ml, NADH 0.18 mMol/L).

Reconstituir un vial de tampón/coenzima/ α -oxoglutarato R1b con 2 mL de R1a tampón/sustrato. El reactivo es estable 14 días, conservar entre +2 - +8°C

RX9. Reactivo de trabajo de bilirrubina total.

R1a. Reactivo DCA (2,4-dicloroanilina 3.0 mMol/L, ácido clorhídrico 80 mMol/L, detergente 3.0 mMol/L).

R1b. Nitrito sódico (3.0 mMol/L)

R2. Reactivo blanco (2,4-dicloroanilina 1.5 mMol/L, ácido clorhídrico 40 mMol/L, detergente 30 g/L).

Mezclar el reactivo DCA (R1a) con el reactivo nitrito (R1b) en proporción 1 + 1.

Reposar a temperatura ambiente durante 15 min, protegido e la luz. El reactivo es estable 21 días, conservar entre +2 - +8°C.

ANEXO II

Solución Buffer de fosfatos (PBS).

Esta solución de sales de fosfato conserva la fisiología celular. 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_2HPO_4) (Sigma, Chem, USA)	2.16 g
-Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) (Sigma, Chem, USA)	0.2 g

Las sales de NaCl, KCl y KH_2PO_4 se disuelven completamente una por una en 800 mL. de agua bidestilada. Una vez disuelto todo se ajusta el pH de 7.2 -7.4 con Na_2HPO_4 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.