



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y CITOTÓXICO  
DEL EXTRACTO ACUOSO DEL *AGAVE PITZOMETL*  
EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER  
CERVICOUTERINO HeLa**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Ojeda Pérez Paola**

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez**

**ASESOR DE TESIS: M. en C. Luis Sánchez Sánchez**



**MÉXICO, D.F.**

**ABRIL 2014**



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

Al **M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez** por todo el apoyo brindado, por su asesoría, conocimientos, aportaciones, paciencia y tiempo dedicado a este proyecto.

Al **M. en C. Luis Sánchez Sánchez** por aceptarme en su laboratorio, por la paciencia, conocimientos, tiempo y recursos dedicados.

Al **Q. Carlos Salvador Valádez Sánchez** por todas aquellas clases de química que he hecho durante algunos años y durante la realización de este trabajo. Por el asesoramiento, revisiones y apoyo dedicado durante este tiempo.

Al **M. en C. Iker Said Escalona Torres** por los comentarios y revisiones a este trabajo.

Al **M. en C. Christian Axel Luviano Jardon** por su asesoramiento, sugerencias, observaciones y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mi querida **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de formar parte de esta máxima casa de estudios. Por darme el apoyo, conocimientos y todas las herramientas para formarme como profesionalista.

## DEDICATORIAS

A mi mamá **Martha Patricia Pérez** León por todo su apoyo, perseverancia, exigencia, regaños y consejos a lo largo de toda mi formación.

A mi papá **Reynaldo Ojeda Ojeda** por la confianza, tiempo y esfuerzo dedicado a lo largo de todos estos años.

Sin ambos el día de hoy no hubiera llegado hasta aquí.

Por su apoyo en todo este tiempo a mi hermano José **Fco. Ojeda Pérez**.

A toda mi familia, en especial a mi abuelita **Concepción León Hernández** por siempre creer y confiar en mí. Gracias.

Por todas y cada una de las clases, consejos, risas y semestres a su lado a **Emmanuel López Miranda y Ricardo Ortiz Alarcon**.

A **Salvador Octavio Lara Quezada** por escuchar todas y cada una de mis quejas con paciencia y darme siempre el apoyo, cariño y animo que necesitaba.

Para todos aquellos amigos y compañeros que no mencione pero siempre has estado cerca de mí. Gracias.

***“En el fondo, los científicos somos gente con suerte, podemos jugar a lo que  
queramos durante toda la vida” Lee Smolin***

***“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces sus frutos”  
Aristóteles***

## **CONTENIDO**

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>3. Marco Teórico</b>	
<b>3.1 Medicina Tradicional</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Medicina Tradicional Mexicana</b>	<b>5</b>
<b>3.3 Farmacognosia</b>	<b>6</b>
<b>3.4 Agave</b>	<b>8</b>
<b>3.5 Agave con actividad antitumoral</b>	<b>9</b>
<b>3.6 Cáncer</b>	<b>12</b>
<b>3.7 Biología y genética del cáncer</b>	<b>13</b>
<b>3.8 Muerte celular</b>	<b>15</b>
<b>3.9 Cáncer Cervicouterino</b>	<b>18</b>
<b>3.10 Virus del Papiloma Humano</b>	<b>19</b>
<b>3.11 Tratamiento</b>	<b>20</b>
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>
<b>5. Objetivo</b>	<b>25</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>26</b>
<b>7. Diseño experimental</b>	<b>27</b>
<b>8. Metodología</b>	<b>29</b>
<b>9. Resultados</b>	<b>36</b>
<b>10. Análisis de resultados</b>	<b>48</b>
<b>11. Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>12. Referencias</b>	<b>53</b>
<b>13. Anexos</b>	<b>58</b>

## GLOSARIO

**Ácido desoxirribonucleico:** El ADN es una macromolécula constituida por subunidades denominadas nucleótidos. Cada nucleótido está formado por tres partes: un grupo ortofosfato (ácido fosfórico), unido a un anillo de desoxirribosa a la cual se une una base nitrogenada. Conforman una doble cadena. Es una biomolécula en la que se almacena y transmite información en forma codificada.

**Agave:** Planta que pertenece a la familia de las agaváceas, es de hojas largas, fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulado.

**Agave Pitzometl:** Es una especie que se distribuye desde el Valle de Zapotitlán de las Salinas hasta la parte Norte de Oaxaca.

**Alcaloides:** Estos son bases orgánicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico.

**Apoptosis:** Las células son capaces de activar una vía de muerte celular programada que se conoce como apoptosis. Desde el punto de vista morfológico, la apoptosis se caracteriza por la condensación de cromatina y el encogimiento celular.

**Cáncer:** Es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo.

**Displasia:** (dis= anormal, plasia= desarrollo). Conjunto de lesiones representadas por epitelios escamosos anormales.

**Ensayo SRB:** La técnica de la suforrodamina B (SRB) es un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la unión electrostática de la SRB a los aminoácidos básicos fijados con ácido tricloroacético (TCA). Esta técnica es sensible, rápida y sencilla.

**Ensayo MTT:** Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan),

permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

**Ensayo WST-1:** La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables.

**Epitelio:** Tejido formado por una o más capas de células que están unidas entre sí y que recubren la superficie de distintos órganos y partes del cuerpo. Forman el revestimiento interno de las cavidades, los conductos y los órganos huecos del cuerpo. Son también una parte de las mucosas y las glándulas.

**Escapo (quiote):** Es la estructura en la que se forman las flores en el agave.

**Glucósido:** Estos son un grupo heterógamo, cualquier compuesto unido a la glucosa se denomina un glucósido.

**Histerectomía:** Extirpación quirúrgica del útero

**IC<sub>50</sub>:** Concentración a la cual se disminuye el 50% de la población celular.

**Línea celular HeLa:** Cultivo celular con Virus del Papiloma Humano tipo 16. El nombre HeLa corresponde a la persona que dono las células.

**Maguey:** Planta de hojas grandes y carnosas que nacen directamente de la raíz y están bordeadas de espinas, tiene flores amarillas en ramillete sobre un alto tallo central; es originaria de terrenos secos de América.

**Mitosis:** Proceso por el cual una célula se divide dando como resultado dos células hijas genéticamente iguales a la madre.



**Necrosis:** Muerte celular que se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos.

**Neoplasia:** Es una alteración de la proliferación y muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor. Una neoplasia (llamada también tumor o blastoma) es una masa anormal de tejido, producida por multiplicación de algún tipo de células; esta multiplicación es descoordinada con los mecanismos que controlan la multiplicación celular en el organismo y los supera. En el caso del cáncer cervicouterino se divide en tres etapas.

**NIC-I (Neoplasia Intraepitelial Cervical):** Lesión intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve.

**NIC-II:** Es una displasia moderada

**NIC-III:** Displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado.

**Oncogenes:** Aumento en la actividad de los genes que estimulan la proliferación.

**Pichomel:** Jarabe hecho a base de agave Pitzometl.

**Pichomela:** Curandera

**Proteína E2F:** Es una proteína reguladora de genes, se une a secuencias específicas del ADN, de las regiones promotoras de los genes que codifican proteínas necesarias para la entrada en la fase S.

**Proteína Rb:** Es la proteína del retinoblastoma, una de sus funciones principales de pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas.

**Saponinas:** Son glucósidos de una forma particular y tri-terpenoides. Se llaman así porque da un efecto como jabón debido a sus propiedades tensioactivas.

**Supresor tumoral:** Son genes que codifican proteínas supresoras de tumores que actúan como un factor de transcripción, al promover la síntesis de proteínas que inhiben el crecimiento celular e inducen la muerte por apoptosis de las células en las cuales el material genético se encuentra dañado.

**Terpenoides:** Estos son los hidrocarburos, algunos de los cuales están oxigenados o sustituidos de otra manera. Estos incluyen sustancias tales como las saponinas y glucósidos cardiacos.

**Virus de la hepatitis B (VHB):** El virus de la hepatitis B es un DNA virus de la familia de los hepadnavirus. Tiene la forma de una esfera de 42 nm de diámetro.

**Virus de la hepatitis C (VHC):** El virus de la hepatitis C es un virus pequeño (30 a 38 nm) con envoltura y con una sola cadena de ARN.

**Virus del papiloma humano (VPH):** Son virus de ADN de cadena doble, pequeño y no desarrollados, encerrados en una cápside proteica icosaédrica de 72 lados.

## 1. RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo una causa importante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial, siendo la tercera causa de muerte entre todos los tipos de cáncer, a pesar de los programas de prevención sobre esta neoplasia. El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública importante ya que es el segundo cáncer más común en mujeres mexicanas solo después del cáncer de mama.<sup>1</sup> No obstante, el éxito de las terapias aplicadas hoy en día para esta enfermedad, son ineficientes en estados avanzados, de alto costo y con efectos colaterales graves, generando la necesidad de implementar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, existe un gran interés por terapias basadas en compuestos y/o extractos de origen natural y específicamente en los de origen vegetal, los cuales han sido descritos como quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos. Dentro de éstos, se ha contemplado la valoración del extracto de *agave Pitzometl*.

En el presente estudio se realizó la obtención del extracto acuoso de *agave Pitzometl* concentrando la solución hasta obtener un polvo, el cual fue utilizado en el bioensayo para determinar la actividad antiproliferativa obteniendo como resultado que la cantidad requerida del extracto de *agave Pitzometl* para inducir un decremento del 50 % en el número celular ( $IC_{50}$ ) en la línea celular HeLa es de 380  $\mu\text{g/mL}$ . Se evaluó la actividad citotóxica por medio de la cuantificación de la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) y por medio de la incorporación celular de Ioduro de propidio (IP) obteniendo como resultado un 5.169 % y un 3.8 % respectivamente.

La actividad apoptótica del extracto, fue evaluada por medio de la técnica de condensación de la cromatina a través de la tinción con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) observado una morfología característica de una muerte apoptótica.

Se evaluó el efecto sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana los cuales fueron tratados con 380 $\mu\text{g/mL}$  de *agave Pitzometl* el cual afecta a

las células linfocíticas únicamente en un 10.6%. Lo cual nos demuestra una ventaja significativa ya que la cantidad de células linfocíticas eliminadas es mínima comparada con las células tumorales.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo.

Es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13 % del total) ocurridas en todo el mundo. Más del 70 % de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030.

En México durante 2010, se observa que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico son el cáncer de mama (29.6 %), el cervicouterino (16.7 %) y el de colon (14.3 %).

La segunda causa de morbilidad hospitalaria entre las mujeres es por cáncer cervicouterino, en el grupo de 65 a 74 años se ubica la tasa más alta (53 casos de cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad), le siguen las mujeres de 50 a 59 años (51 de cada 100 mil mujeres de este grupo de edad), entre las acciones para prevenirlos se encuentran la vacuna de Papiloma Humano (VPH), la detección oportuna y el uso de condón. <sup>1</sup>

Los factores de riesgo involucran, el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad, haber tenido varias parejas sexuales y el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos, infección del virus del papiloma humano (VPH) asociado en un 97.9 % de los casos, así como una detección tardía, son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión del cáncer cervicouterino.<sup>2</sup> No obstante el éxito de las terapias aplicadas para el tratamiento del cáncer, éstas resultan ser ineficientes en pacientes terminales, de alto costo,

agresivas y con fuertes efectos colaterales, generando la necesidad de buscar o implementar nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad. Al respecto, en la literatura se ha descrito una diversidad de compuestos y extractos naturales con actividades biológicas diversas, destacando la actividad antitumoral. Actualmente existe un interés general por la evaluación antitumoral de extractos provenientes de vegetales o frutas, que en diferentes poblaciones se les ha atribuido una actividad antitumoral, sin embargo, la mayoría carecen de pruebas que permitan corroborar dicha actividad. En el caso particular de las plantas pertenecientes a la familia Agavaceae, incluyen más de 300 especies, (de las cuales 261 se encuentran en México), que son ricas en flavonoides, saponinas, terpenos y sapogeninas, moléculas que han sido descritas con actividad antitumoral.<sup>3</sup>

En recientes estudios los extractos obtenidos de *Agave lechugilla Torr* y *Agave americana* han demostrado actividad antiproliferativa y citotóxica en líneas celulares de cáncer cervicouterino, mama y riñón.<sup>4,5</sup>

Se conoce que en los estados de Puebla y Oaxaca se encuentra el *agave Pitzometl*, el cual tiene un uso medicinal potencial, entre algunos otros como antitumoral. Este agave es conocido como “Pitzometl” o “agave curandero”.<sup>6</sup> Sin embargo, no se han descrito estudios que confirmen que realmente presente esta actividad. Con la intención de confirmar o descartar que el *agave Pitzometl* presenta actividad antitumoral o no, se generará un extracto acuoso del *agave Pitzometl* y se determinará la actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica del extracto en cultivos de la línea tumoral de cérvix humano HeLa. El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio L-312 de Síntesis de Fármacos y Materias Primas y en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, ubicado en el edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), laboratorio 2, PB.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Medicina tradicional**

La medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina «alternativa» o «complementaria».

Este tipo de medicina se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad. Las medicinas naturales son infusiones, preparaciones y productos acabados cuyos ingredientes activos son partes de plantas u otros materiales vegetales.

#### **3.2 Medicina Tradicional Mexicana**

Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina tradicional. Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país. Además de ser el tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental en lenguas y culturas distintas.<sup>7, 8</sup>

Los datos sobre las características vegetales, formas de uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de numerosas plantas medicinales, se consignan en las fuentes más antiguas, tales como los códices precolombinos, las crónicas y relaciones coloniales, los estudios y colectas de los siglos XVIII y XIX y su permanencia ha sido una constante en las culturas indígenas y populares del país

Las plantas medicinales han sobrevivido, a lo largo de la historia y siempre han sido utilizadas en mayor o menor medida por el hombre por lo cual es importante reconocer su importancia, así como hacer el uso y estudio adecuado de estas para evitar la extinción o cambio en el ecosistema de dichas plantas.<sup>9</sup>

### **3.3 Farmacognosia**

Es el estudio de la composición y los efectos de los principios activos y sustancias naturales de origen animal y vegetal, como materias primas de origen biológico, siendo la mayoría de origen vegetal, en su aspecto botánico, cultivo, recolección, conservación, composición química, naturaleza de sus principios activos, ensayos de caracterización y valoración, actividad farmacológica y sus principales aplicaciones". Se ocupa de especies que se emplean en la industria farmacéutica, utilizando principios activos como modelo para la semisíntesis y síntesis de otros compuestos con actividad terapéutica: anestésicos locales (cocaína, morfina), Hormonas (diosgenina) aceites de origen vegetal (aceite de oliva, aceite de ricino).

#### **3.3.1 Fitoquímica**

La Fitoquímica es una especialidad que deriva de la Farmacognosia con fines terapéuticos y se dedica al estudio químico de las plantas medicinales.<sup>10</sup>

La Fitoquímica tiene una gran importancia para la determinación de los componentes activos de las plantas medicinales, su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana.<sup>11</sup>

Trata sobre los métodos de obtención de esos componentes activos, su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico a que pertenece y estudia los métodos analíticos para comprobar su calidad.

Un estudio fitoquímico puede implicar lo siguiente: identificación y extracción del material vegetal; separación, aislamiento e identificación de los componentes de interés de los compuestos aislados y evaluaciones cualitativas y cuantitativas.



El inicio de la investigación empieza con la recolección y secado de las plantas a estudiar, también se puede requerir de una molienda, dependiendo de las características botánicas del objeto de estudio.<sup>12</sup> Los productos de origen natural puros se caracterizan por su composición química variada y por consiguiente es necesario someterlos a procesos de extracción, separación y purificación, para así evitar impurezas o contaminaciones.<sup>13</sup>

### **3.3.2 Recolección**

El momento de la recolección puede ser un factor que impacte en la cantidad de sustancias activas (metabolitos secundarios) que se obtengan en el extracto final, factores como la estación del año, la edad de la planta, la cantidad de humedad en el ambiente o la cantidad de sol y luz que se tenga, afectará significativamente el rendimiento y calidad de los principios activos. La recolección se hace de las diferentes partes de las plantas como pueden ser hojas, tallos, raíces y flores.

### **3.3.3 Secado**

Las plantas, al ser removidas de sus ambientes naturales, inician una serie de procesos degenerativos que se deben evitar para la conservación de los compuestos de interés. Una operación útil para este fin, es el secado, proceso por el cual aproximadamente el 70 % de agua se elimina de las plantas para evitar la acción enzimática.<sup>14</sup>

### **3.3.4 Extracción**

Las técnicas de extracción se realizan para aislar los principios activos del material vegetal.

La extracción con disolventes consiste en colocar en contacto las partes de la planta con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos, obteniendo un extracto líquido que posteriormente se puede concentrar eliminando el disolvente.<sup>15</sup>

### **3.3.4.1 Destilación**

Es una técnica que se basa en la diferencia entre los puntos de ebullición de los componentes de la planta, lo cual permite la separación de unos componentes de otros con diferente punto de ebullición. Existen varias formas de destilar por ejemplo la destilación por arrastre de vapor o a presión reducida.

### **3.3.4.2 Destilación a presión reducida**

En la destilación a presión reducida sabemos que un líquido logra llegar a su punto de ebullición cuando su presión de vapor iguala a la presión atmosférica o de operación, por lo tanto si reducimos la presión de operación tendremos la ebullición a temperaturas más bajas que en condiciones normales.<sup>16</sup>

## **3.4 Agave**

Contra lo que algunas personas creen, el agave no es un cactus, es una planta que pertenece a la familia de las agaváceas, es de hojas largas, fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulado, cuya parte aprovechable para la elaboración del tequila es la piña o cabeza.

El agave se ha aprovechado entre otras cosas en:

- Vallas para guardar heredades (terrenos dedicados al cultivo)
- Tejas o techumbres, las hojas o pencas
- Vigas, los tallos o quiotes
- Hilaturas para tejidos, las fibras de las pencas
- Papel
- Clavos, punzones, agujas, las puntas (espinas) de las pencas
- Zumo, licor, vinagre, miel, azúcar

Maguey es una palabra que proviene de las Antillas. Es una planta de hojas grandes y carnosas que nacen directamente de la raíz y están bordeadas de espinas, tiene

flores amarillas en ramillete sobre un alto tallo central En nuestra región y en diferentes culturas se le reconoció con varios nombres:

- Metl en Náhuatl
- Tocamba en Purépecha
- Guada en Otomí

No obstante que el agave no es sólo de México, en ningún otro lugar del mundo es tan identificado con la cultura, el paisaje y el pueblo como en nuestro país.<sup>17</sup>



Figura 1. Agave bovicornuta Imagen tomada de:  
<http://soulofthegarden.com/Agaves.html>

### 3.5 Agaves con actividad antitumoral

#### 3.5.1 *Agave lechugilla* Torr

El *Agave lechugilla* Torr se encuentra en Chihuahua, Coahuila y el desierto de Sonora en México. El extracto de *A. lechugilla* fue obtenido mediante secado al aire y cortado en piezas de alrededor de 1cm<sup>2</sup>. Se agregó etanol y se agitó a temperatura ambiente durante siete días. El filtrado obtenido fue evaporado a sequedad utilizando un rotavapor. Se obtuvo una saponina que fue aislada del extracto de *A. lechugilla* Torr y posteriormente los cristales de dicha saponina. Los cristales de la saponina fueron obtenidos mediante un reflujo y posterior evaporación hasta su formación.

El extracto de etanol obtenido a partir de hojas de *Agave lechugilla* Torr demuestra una actividad citotóxica en la línea celular HeLa con un 50 % de concentración inhibitoria IC<sub>50</sub> de 89 µg/mL. La saponina cruda muestra una IC<sub>50</sub> de 95 µg/mL. La fracción obtenida para el aislamiento de la saponina 5-β saponina esteroideal muestra una IC<sub>50</sub> de 78 µg/mL.

Ni el extracto ni la saponina mostraron una toxicidad significativa en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 con una IC<sub>50</sub> menor a 150 µg/mL.

El extracto, la saponina aislada y la saponina cristalizada mostraron una citotoxicidad en células Vero con valores de IC<sub>50</sub> de 126, 171.6 y 172.2 µg/mL respectivamente.<sup>4</sup> La actividad citotóxica determinada en las tres líneas celulares fue realizada mediante el ensayo WST-1.

IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MCF-7	HeLa	Vero
<b>Extracto con etanol</b>	>150	89	126
<b>Saponina cruda</b>	>150	95	171.6
<b>Saponina Cristalizada</b>	>150	78	172.2

Tabla1. Citotoxicidad (µg/mL) de extracto de etanol y saponina aislada de *A. lechugilla* Torr en células MCF-7, Hela y Vero.

### 3.5.2 *Agave americana*

El *Agave americana*, es usado tradicionalmente para tratar la presión alta. El agave cuando se encuentra concentrado tienen actividad antibacterial, y los extractos de la planta de agave tienen efectos antiinflamatorios y antitumorales.

Las hojas de *Agave americana* fueron secadas y extraídas con metanol con un aparato soxhlet. Se realizaron los ensayos con SRB y MTT en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

El extracto de *Agave americana* tiene un valor de IC<sub>50</sub> de 545.9 µg/mL por el ensayo SRB y una IC<sub>50</sub> de 826 µg/mL en el ensayo MTT en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.<sup>5</sup>

Línea celular	Ensayo MTT	Ensayo SRB
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>MCF-7</b>	826.1	545.9

Tabla2. Determinación de la citotoxicidad del *Agave americana* por medio del ensayo SRB y MTT en la línea celular MCF-7

### 3.5.3 Agave Pitzometl

El *agave Pitzometl* es una especie que se distribuye desde el Valle de Zapotitlán de las Salinas hasta la parte Norte de Oaxaca, es muy apreciado por los pobladores pues además de extraer el tradicional mezcal, tiene un uso medicinal potencial que hasta estos días ha sido místicamente restringido para la llamada “Pichomela” cuyo nombre hace alusión al adjetivo “curandera”. De hecho, este agave es conocido como “Pitzometl” o “agave curandero”.<sup>6</sup>

Zapotitlán de las Salinas en Puebla está dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. El área se localiza al Sur del Estado de Puebla entre los 18 10' y los 18 27' 30" de latitud norte y entre los 97 22' 30" y los 97 40' longitud oeste, comprende una superficie aproximada de 1 004 km<sup>2</sup> (100 400 has), su altitud va de los 1 242 a los 2 800 metros sobre el nivel del mar (figuras 2 y 3).<sup>18</sup>



Figura 2. Agave Pitzometl. Imagen proporcionada por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez.



Figuras 3. Mapa del Edo. De Puebla. Donde se localiza la región del Valle de Tehuacán. Imagen tomada de: [http://mexicoquerido.com.mx/puebla/es/destinos/dePdes.php?\\_idDestino=42](http://mexicoquerido.com.mx/puebla/es/destinos/dePdes.php?_idDestino=42)

Los pobladores le atribuyen propiedades curativas y lo utilizan para la fabricación casera del Pichomel. Sin embargo no existen estudios del agave Pitzometl utilizado como un agente antitumoral.<sup>19, 20</sup>

Todas las plantas del género *Agave* contienen glucósidos, terpenoides, alcaloides, esteroides, entre los que destaca la hecogenina, así como saponinas que han mostrado diversas actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, antimicótica, entre otros) fundamentalmente se han constituido desde hace bastante tiempo, como precursores únicos de muchos medicamentos esteroidales tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos.

### **3.6 Cáncer**

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco, obesidad, inactividad física, consumo de bebidas alcohólicas, entre otras. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana.<sup>21</sup>

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis, que son la principal causa de muerte por cáncer.<sup>22, 23</sup>

Los principales tipos de cáncer son los siguientes:

- pulmonar (1,37 millones de defunciones);

- gástrico (736 000 defunciones);
- hepático (695 000 defunciones);
- colónrectal (608 000) defunciones;
- mamario (458 000 defunciones);
- cervicouterino (275 000 defunciones).

Más del 70 % de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030.<sup>24</sup>

### **3.7 Biología y genética en el cáncer**

El cáncer es una enfermedad compleja que surge por alteraciones genéticas que modifican las diversas funciones celulares como proliferación, muerte celular programada y envejecimiento, las que, en última instancia, controlan el número de células de una población. El daño genético subyacente al desarrollo del cáncer tiene causas diversas y, a menudo, la pérdida de los mecanismos de reparación del ADN es uno de los factores que permite la acumulación de mutaciones. Los cánceres también se caracterizan por la capacidad para invadir los tejidos circundantes, estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y producir metástasis.<sup>25</sup>

- Ciclo celular

La mitosis es el proceso por el cual una célula se divide dando como resultado dos células hijas genéticamente iguales a la madre, recibiendo así los 46 cromosomas completos. La mitosis sola, es decir el proceso de división nuclear, se realiza en un corto periodo de tiempo pero forma parte de un proceso cuidadosamente programado llamado ciclo celular.<sup>26</sup>

Justo después de la división celular aquellas células que están destinadas a dividirse otra vez entran en el estadio llamado G1, mientras que las que no se dividirán mas entran en la fase de reposo llamada G0. Las células en fase G1 pasan después a la fase S, durante la cual el ADN se duplica. El resultado de este proceso es que cada uno de los 46 cromosomas se duplica en 2 cromatides hermanas exactamente

iguales, unidas por una zona de constricción central llamada centrómero. Al final de la fase S se inicia la fase G2 la cual lleva a la mitosis propiamente dicha. El ciclo celular se muestra en la figura 4.<sup>27</sup>

Durante la mitosis las cromátides hermanas y el centrómero se hacen patentes y se alinean para la separación. Se realiza a nivel del centrómero de todas las 46 cromátides hermanas de manera que cada una de ellas se dirige a una de las células hijas. De esta manera se completa el ciclo celular normal.<sup>28</sup>

Los reguladores de la progresión de la fase G1, es decir, los que permiten que la célula entre en división en vez de reposo (o fase G0), son los más afectados en la carcinogénesis. Durante la fase G1 la célula responde a ciertas señales extracelulares que la harán dividirse o permanecer en reposo a la fase G0. Al contrario que en la fase de transición las fases S, G2 y M, la progresión de la fase G1, generalmente, se basa en la estimulación por mutágenos y puede ser bloqueada por citocinas antiproliferativas. Las células cancerosas pierden este control y tienden a permanecer en el ciclo de replicación celular.<sup>29, 30</sup> Como la maduración y diferenciación celular se favorecen cuando la célula sale de este ciclo celular, las células cancerosas también tienden a perder esta propiedad. La decisión final sobre la división celular se toma cuando la célula pasa por una zona de restricción al final de la fase G1, después de este punto son refractarias a las señales extracelulares de regulación de crecimiento.<sup>31</sup> Figura 4.



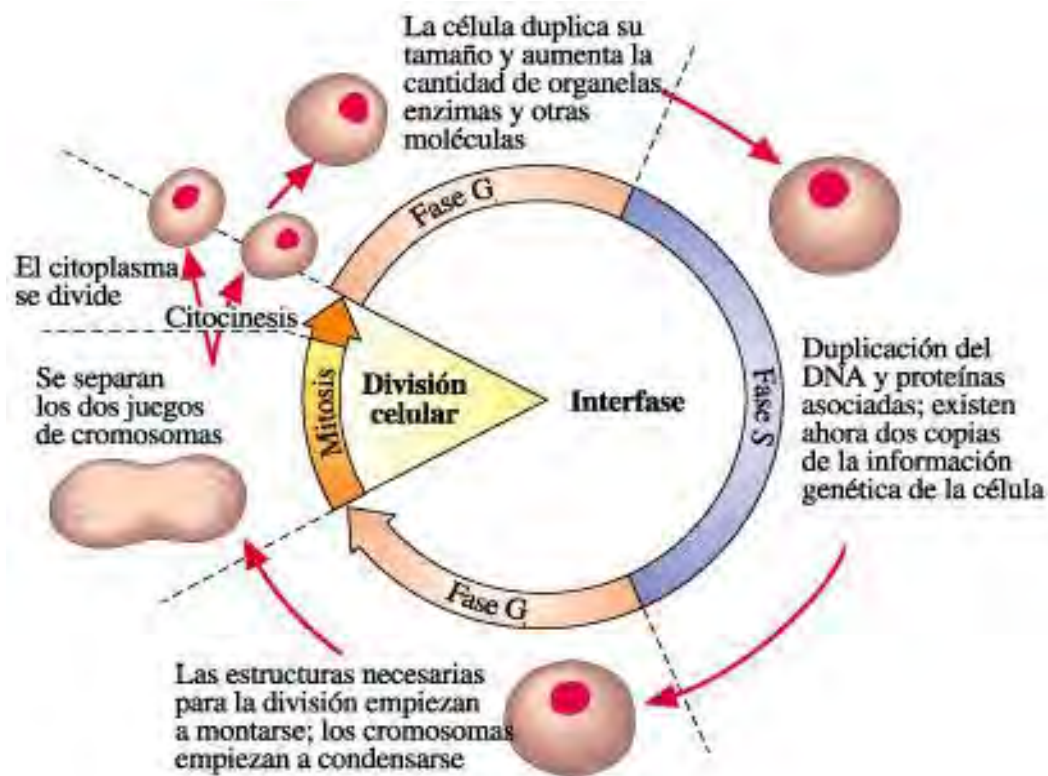


Figura 4. Descripción de las Fases del Ciclo Celular. Imagen tomada de: <http://mtrarebecabiologia.blogspot.mx/2013/03/ciclo-celular.html>

### 3.8 Muerte celular

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada. El número de células de esta comunidad está regulado con precisión no solo controlando la velocidad de la división celular, sino también regulando el ritmo de la muerte celular, aquellas células que ya no son necesarias se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte.<sup>32</sup> En condiciones fisiológicas las células dañadas, las que están sujetas a recambio y las senescentes, se eliminan a través de un tipo de muerte celular denominado apoptosis. Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular, porque cuando se altera, se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer.<sup>33</sup>

Por otro lado existe otro tipo de muerte celular que responde a una lesión aguda donde suelen hincharse y romper la membrana plasmática, dicho proceso es

considerado como necrosis celular la cual es un tipo de muerte que da lugar a una respuesta inflamatoria potencialmente perjudicial.<sup>34</sup>

### **3.8.1 Apoptosis**

Las células son capaces de activar una vía suicida de muerte celular programada que se conoce como apoptosis. La apoptosis es un proceso activo dependiente de energía que comprende la división de la célula por acción de endonucleasas, así como de las proteínas por efecto de proteasas. Desde el punto de vista morfológico, la apoptosis se caracteriza por la condensación de cromatina y el encogimiento celular. Esto contrasta con el proceso de necrosis, caracterizado por la pérdida de la regulación osmótica y fragmentación celular.<sup>35</sup>

La regulación de la apoptosis depende de un equilibrio entre estímulos como factores de crecimiento que favorecen la supervivencia y los que fomentan la muerte. La apoptosis puede desencadenarse por el retiro de los factores de supervivencia o por agentes que dañan el ADN, como la quimioterapia y la radiación.<sup>36</sup>

Las vías de apoptosis son determinantes en la prevención como en el tratamiento del cáncer. Primero como normalmente el tamaño de la población celular es estático el crecimiento de la neoplasia podría ser, desde un punto de vista teórico, como resultado del aumento en la proliferación celular o de la disminución de la apoptosis. La apoptosis tiene una función importante en la prevención de la transformación maligna además de contrarrestar la proliferación porque elimina las células que sufrieron mutaciones.

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de aspártico seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa. Las caspasas son producidas como precursores inactivos llamados procaspasas que son posteriormente hidrolizados para generar enzimas activas, frecuentemente por otras caspasas en una cascada proteolítica; una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas

dentro de las células, lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan.

La caspasa más prevalente en la célula es la caspasa 3, la cual es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con la caspasa 6 y 7. Estas son, en último término, las que degradan una amplia gama de sustratos durante la apoptosis.<sup>37</sup>

### **3.8.2 Necrosis**

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales líticas y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana. Mientras que una participación activa de la célula afectada involucra la síntesis de proteínas, característica esencial, en la apoptosis, la necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria como se muestra en la figura 5.<sup>38</sup>

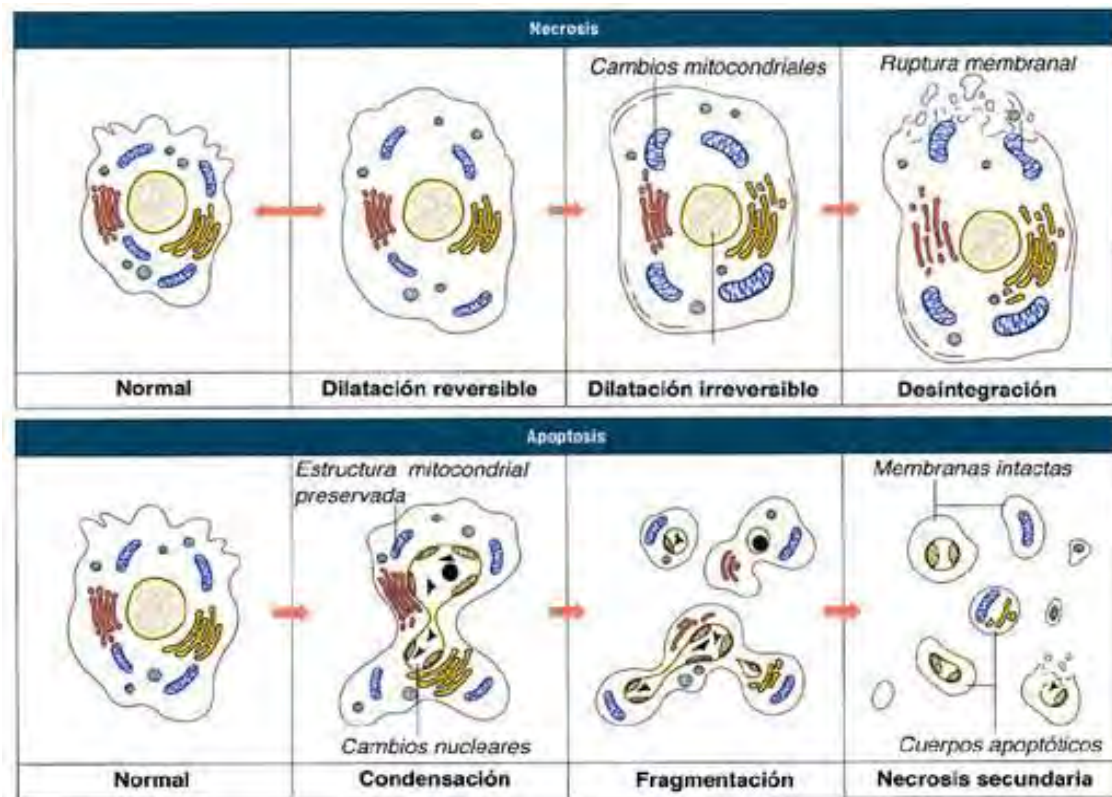


Figura 5. Fases de muerte celular por necrosis y apoptosis. Imagen tomada de: <http://lasantabiologia.blogspot.mx/2009/02/apoptosis-y-necrosis-la-lupa1-parte.html>

### 3.9 Cáncer Cervicouterino (CaCu)

El cáncer cervicouterino se mantiene en todo el mundo como el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres: representa 15% de todos los tumores malignos en ese género. En muchos países en vías de desarrollo es el cáncer más común entre las mujeres; constituye 20 a 30% de los cánceres femeninos.<sup>39</sup>

Los factores de riesgo involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad, haber tenido varias parejas sexuales y el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos, así como una detección tardía, son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión del CaCu.<sup>40</sup>

Los eventos tisulares en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con el cáncer *in situ* denominado

Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión Intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado estas lesiones se muestran en la figura 6. Presentándose de esta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico.<sup>41, 42</sup>

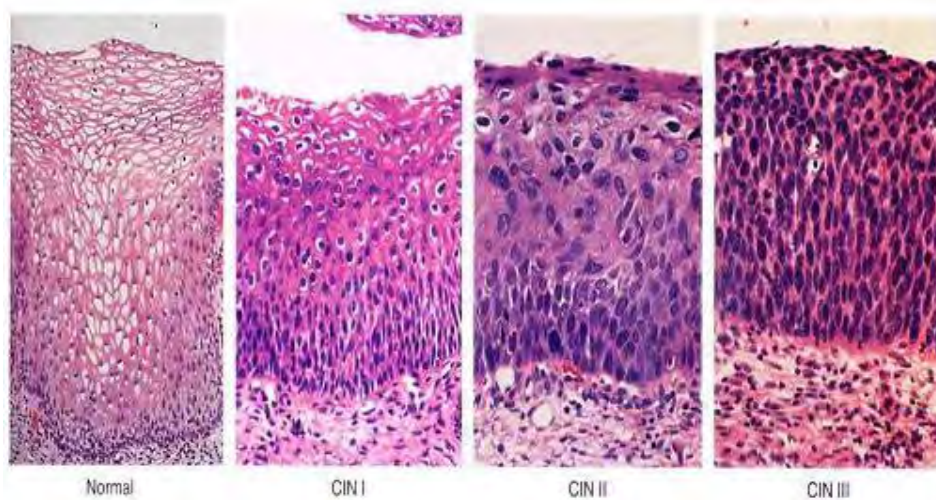


Figura 6. Células del Cérnix que muestran las diferentes neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) Imagen tomada de: <http://cancerdecervi.blogspot.mx/>

### 3.10 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Dentro de los diferentes factores que aumenta el riesgo de contraer CaCu, destaca la infección del virus del papiloma humano (VPH) asociado en un 97.9% de los casos con la infección.

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus de ADN de cadena doble, pequeño y no desarrollados, encerrados en una cápside proteica icosaédrica de 72 lados. El genoma del VPH consiste en ADN circular de cadena doble con cerca de 7 900 partes de bases. Los virus del papiloma humano constituyen un grupo divergente de virus con relaciones evolutivas y características similares pero enormes diferencias en especificidad de especie, sitio de predilección y potencial oncógeno. Las secuencias de más de 70 tipos de VPH ya están identificadas.<sup>43</sup>

En particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cervicouterino es negativo a VPH. No obstante, la infección del VPH no es causa suficiente para la malignidad, se necesita de la colaboración de cofactores para la progresión y persistencia de la infección. Estos incluyen factores del hospedero como respuesta inmunológica, influencia de hormonas y otras infecciones transmitidas sexualmente. De esta forma la asociación de la infección con VPH y el desarrollo de cáncer no es absoluta, ya que la mayoría de las mujeres infectadas con este virus no padecen cáncer cervicouterino.

La infección por VPH se presenta a través de microheridas en el epitelio que exponen células de la lámina basal a la infección viral. Las células de la lámina basal son células que están en constante división y proveen un reservorio de células para la región suprabasal. La infección viral activa la maquinaria celular para producir de 20 a 100 copias extracromosomales del ADN viral por célula.<sup>44</sup>

### **3.11 Tratamiento de CaCu**

Las opciones de tratamiento para el cáncer del cuello uterino dependen principalmente de la etapa del cáncer. Los tres tipos principales de tratamiento contra el cáncer de cuello uterino son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Algunas veces el mejor plan de tratamiento incluye dos de estos métodos o más. Si no es posible lograr una curación, la meta podría ser extirpar o destruir la mayor parte posible del cáncer para evitar que el tumor crezca o se propague<sup>45</sup>, como se muestra en la figura 7.

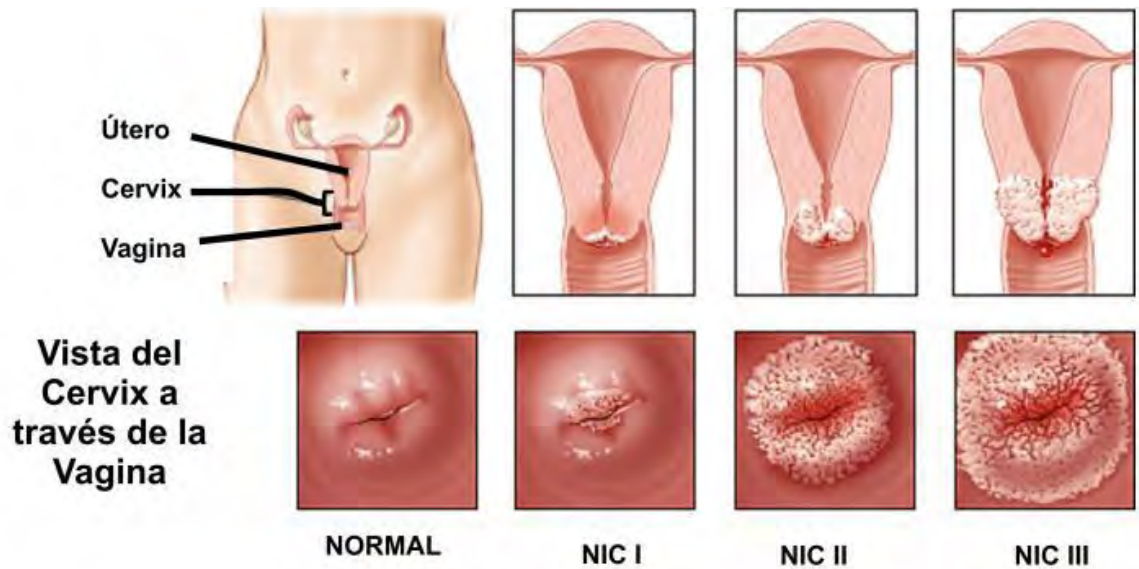


Figura 7. Vista de tejido canceroso en útero. Imagen tomada de: [http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/1\\_2\\_-Qu-es-C-ncer-.html](http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/1_2_-Qu-es-C-ncer-.html)

## Cirugía

Existen varios tipos de cirugía contra el cáncer del cuello uterino. En algunas se hace la extirpación del útero (histerectomía), mientras que en otros no. Si el cáncer se ha propagado fuera del útero, puede que sea necesario extirpar otros órganos, tales como el colon.<sup>46</sup>

**Criocirugía:** Este método se utiliza para tratar el cáncer pre-invasor del cuello uterino, pero no para el cáncer invasor. Las células cancerosas se destruyen mediante la congelación.

**Cirugía por láser:** Se emplea un rayo láser para quemar las células o para extraer una muestra pequeña de tejido para estudiarlo. La cirugía por láser se usa sólo como tratamiento contra el cáncer pre-invasor del cuello uterino.

**Histerectomía:** Se extirpa el útero, pero no los tejidos contiguos al útero. En este procedimiento no se extirpa la vagina ni los ganglios linfáticos. El útero se extirpa a través de una incisión en la parte delantera del abdomen o a través de la vagina. Después de esta operación, una mujer no puede quedar embarazada.<sup>47</sup>

## **Radioterapia**

La radioterapia es un tratamiento que usa rayos de alta energía (rayos X) para eliminar o encoger las células del cáncer. La radiación puede provenir de fuera del cuerpo (radiación externa) o de materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (radiación interna o implante).<sup>48</sup>

La radiación puede causar efectos secundarios. La mayoría de éstos desaparecen después de un corto período de tiempo. La piel en el área tratada puede parecer como quemada por el sol, y más tarde bronceada. La piel vuelve a la normalidad en un plazo de entre 6 y 12 meses. También pudiera presentar cansancio, malestar estomacal. El tratamiento en el área de la pelvis puede hacer que la vagina se vuelva más angosta, debido a la formación de tejido cicatricial. Esto puede producir dolor durante las relaciones sexuales. También puede presentarse una menopausia prematura y problemas para orinar. Las fracturas son otro efecto secundario de la radiación administrada a la pelvis. La mayoría de éstas son fracturas de la cadera. El riesgo aumentado se observa entre dos a cuatro años después del tratamiento.<sup>49</sup>

## **Quimioterapia**

La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células del cáncer. Usualmente los medicamentos se administran por vía intravenosa u oral. Una vez que los medicamentos entran en el torrente sanguíneo, llegan a todo el cuerpo. A veces, se administran varios medicamentos al mismo tiempo.

La quimioterapia puede ocasionar efectos secundarios. Estos efectos secundarios dependerán del tipo de medicamento administrado, la cantidad administrada y la duración del tratamiento. Los efectos secundarios podrían incluir los siguientes:

- Malestar estomacal y vómitos (existen medicamentos que administrados simultáneamente con la quimioterapia pueden prevenir o reducir las náuseas y los vómitos).
- Pérdida del apetito.



- Caída temporal del cabello.
- Llagas en la boca.
- Aumento de la probabilidad de infecciones (debido a los bajos niveles de glóbulos blancos).
- Sangrado o hematomas después de pequeñas cortaduras o lesiones menores (por la disminución de las plaquetas).
- Dificultad para respirar (por la disminución de los niveles de glóbulos rojos).
- Cansancio.

La mayoría de los efectos secundarios de la quimioterapia (excepto la menopausia y la infertilidad) desaparecen una vez que se termina el tratamiento.<sup>50</sup>

#### 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino se encuentra en todo el mundo como el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres: representando el 15% de todos los tumores malignos en ese género. En muchos países en vías de desarrollo es el cáncer más común entre las mujeres; constituye del 20 al 30 % de los cánceres femeninos.<sup>1</sup>

Las opciones de tratamiento para el cáncer cervicouterino dependen principalmente de la etapa del cáncer. Los tres tipos principales de tratamiento contra el cáncer cervicouterino son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Algunas veces el mejor plan de tratamiento incluye dos de estos métodos o más. Si no es posible lograr una curación, la meta podría ser extirpar o destruir la mayor parte posible del cáncer para evitar que el tumor crezca o se propague. Estos tratamientos en su mayoría son agresivos y no siempre se obtienen los resultados esperados.

Dependiendo del tipo, cantidad y duración del tratamiento pueden provocar diferentes efectos secundarios como son: malestar estomacal y vómitos, pérdida del apetito, caída temporal del cabello, llagas en la boca, cansancio, menopausia prematura, dolor al orinar, entre otros.<sup>49</sup>

Por estas razones en la actualidad se busca encontrar compuestos de origen natural que tengan actividad antitumoral como una alternativa a los tratamientos tradicionales.

En México en la región del Valle de Zapotitlán de las Salinas hasta la parte Norte de Oaxaca se encuentra el agave *Pitzometl* el cual es muy apreciado por los pobladores pues además de extraer el tradicional mezcal, tiene un uso medicinal potencial, se elabora un jarabe llamado "Pichomel" utilizado contra la tos, asma y golpes internos, además de que es usado como antiinflamatorio y antitumoral.

Sin embargo no obstante su poder curativo descrito por lugareños, se carece de estudios científicos que confirmen y avalen la actividad biológica de esta planta por lo que se planteo la siguiente pregunta de investigación:

¿El extracto acuoso del *agave Pitzometl* tiene alguna actividad antiproliferativa y presenta efecto citotóxico en líneas celulares del cáncer cervicouterino (HeLa)?

## 5 OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar el potencial antiproliferativo y efecto citotóxico del extracto acuoso de agave *Pitzometl* en cultivos de células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa).

### Objetivos particulares

- ✓ Obtención del extracto acuoso de *agave Pitzometl*.
- ✓ Realizar cultivos de la línea tumoral HeLa proveniente de cáncer cervicouterino.
- ✓ Determinar la cantidad requerida del extracto de agave *Pitzometl* para inducir un decremento del 50 % en el número celular ( $CI_{50}$ ) en la línea celular HeLa.
- ✓ Evaluar si el extracto acuoso de agave *Pitzometl* presenta efecto citotóxico por medio de la cuantificación de la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH).
- ✓ Evaluar si el extracto acuoso de agave *Pitzometl* presenta efecto citotóxico por medio de la incorporación celular de Ioduro de propidio (IP).
- ✓ Evaluar si el extracto acuoso de agave *Pitzometl* presenta efecto apoptótico por medio de la técnica de condensación de la cromatina.
- ✓ Evaluar si el extracto acuoso de agave *Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos de sangre periférica.

## 6 HIPÓTESIS

Las plantas del genero agave son ricas en terpenos, alcaloides, flavonoides y principalmente saponinas, moléculas que han sido ampliamente utilizadas en ensayos antitumorales. Estudios recientes demuestran que el *Agave lechugilla Torr* y el *Agave americana* presentan actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer cervicouterino Hela y de cáncer de mama MCF-7. Por lo anterior se espera que el extracto acuoso del *agave Pitzometl* promueva un efecto en la actividad antiproliferativa de líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa).

## 7 DISEÑO EXPERIMENTAL

**Tipo de estudio:** Experimental

**Población de estudio:** Línea celular de cáncer cervicouterino HeLa

### **Criterios de inclusión**

Líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa recién sembradas

### **Criterios de exclusión**

Líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa que hayan sido utilizadas en otro estudio

### **Criterios de eliminación**

Líneas celulares de cáncer cervicouterino que sean diferentes a HeLa

Líneas celulares contaminadas (bacterias, hongos u otras células)

### **Variables**

Variable de control: Obtención del extracto acuoso del agave Pitzometl

Variable de respuesta: Proliferación celular, IC<sub>50</sub>, necrosis celular

**Método estadístico:** Análisis de varianza (ANDEVA), con una significancia de 0.05

### **Reactivos, Material y Equipo**

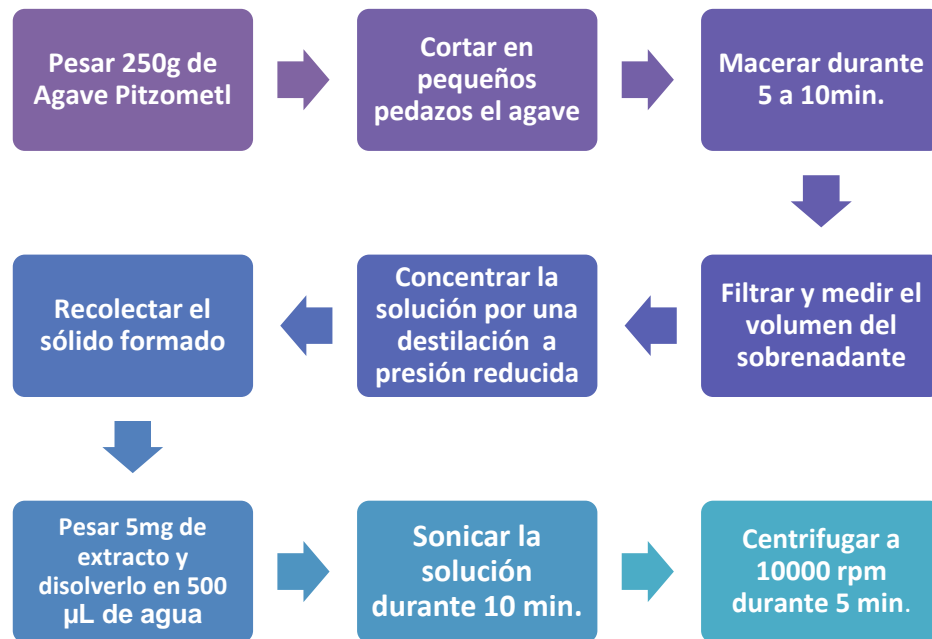
<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>
Agave Pitzometl	
Agua destilada	
Medio de cultivo RPMI-1640	Sigma Chemical Co. USA
Buffer de fosfatos (PBS)	Sigma Chemical Co. USA
Verseno	Sigma Chemical Co. USA
Glutaraldehido 1.1%	Sigma Aldrich USA
Cristal Violeta 0.1%	Sigma Aldrich USA
Ácido acético 10%	Sigma Aldrich USA

<b>Material</b>	
Parrilla de agitación y calentamiento	
Matraz bola de 500mL	Pyrex USA
Matraz bola de 250mL	Pyrex USA
Cabeza de destilación 14/20	Pyrex USA
Cola de destilación 14/20	Pyrex USA
Refrigerante 14/20	Pyrex USA
Termómetro -10° a 150°C	
Agitador magnético	
Placa de 96 pozos	Corning USA
Agitador de placas	Labnet National Labnet Company
Tubos Eppendorf	
Gradilla	
Soporte Universal	
Embudo de tallo corto	Pyrex USA
Pinzas de tres dedos	
Papel parafilm	
Portaobjetos	
Cámara de Neubauer	Clay Adams USA
Probeta de 50mL	Pyrex USA
Tubos con tapón de rosca	
Tubos con membrana de celulosa	

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>
Bomba de vacío	
Centrifuga	HermLe Z200A
Autoclave	IMMSA
Incubadora	Nuaire us Autoflow
Micropipetas (20,100, 200,1000 µL)	Gilson
Microscopio	AusJENA SEDIVAL
Balanza analítica	SCIENTECH
Estufa	Thermo scientific
Refrigerador	Daewoo Freezer & Refrigerator
Espectrofotómetro	Image Tecan Spectra
Lector de placas de ELISA	SofMaxPro USA

## 8 METODOLOGÍA

### Obtención del extracto acuoso del agave Pitzometl



### Ensayo antitumoral



### **Obtención del extracto acuoso de agave *Pitzometl***

- ✓ En una balanza analítica se pesaron 250 g de *agave Pitzometl*, el cual fue cortado en pequeños pedazos (3 cm<sup>3</sup>).
- ✓ Se agregaron 500 mL de agua y se licuó durante 20 min. Posteriormente fue filtrado con manta de cielo y recolectado el sobrenadante.
- ✓ El sobrenadante se concentro mediante una destilación a presión reducida.
- ✓ El polvo obtenido fué pesado y guardado en un frasco ámbar.
- ✓ Posteriormente se pesaron 5 mg del extracto, los cuales fueron disueltos en 500 µL de agua. La solución fue colocada en un baño de ultrasonido durante 10 min para mejor la solubilidad del agave.
- ✓ La solución obtenida se centrifugó (HermLe Z200A) a 10 000 rpm durante 5 min.
- ✓ Se recolectó el sobrenadante y posteriormente fue utilizado para las pruebas en células tumorales.

### **Cultivo de células tumorales**

Las células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa fueron sembradas en cajas petri de cristal (Pirex USA), en 10 mL de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside), con rojo de fenol, al 10 % de suero de neonato de cabra (CNS) desactivado a 56 °C por 30 min (Gibco BRL). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda a saturación en un incubadora (Nuair US Autoflow). Para la realización de los ensayos los cultivos se desarrollaron hasta un 60-70 % de saturación de la caja de cultivo, para posteriormente ser utilizados.

### **Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación de colorante cristal violeta**

- ✓ Para determinar la IC<sub>50</sub> fueron sembradas 7500 células por pozo en una caja de cultivo de 96 pozos (Corning, USA) con 100 µL de medio RPMI-1640 al 5 % de CNS de la línea celular HeLa, cultivadas por 24 h.



- ✓ Fue retirado el medio de cultivo y se adicionó el extracto acuoso de *agave Pitzometl* previamente preparado haciendo diluciones seriadas del compuesto.
- ✓ En un tubo se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 y 200  $\mu\text{L}$  de extracto, se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y fueron agregados a un tubo con 500  $\mu\text{L}$  de medio RPMI
- ✓ Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de esta solución y se agregaron a un tubo con 500  $\mu\text{L}$  de medio. Se repitió esta operación de tal manera que se obtuvieron las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78  $\mu\text{L}/500\mu\text{L}$ .
- ✓ Finalmente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de RPMI-1640 con suero a cada tubo.
- ✓ La placa de cultivo de 96 pozos con 7500 células/pozo se trató con 100  $\mu\text{L}$  de estas concentraciones. Se dejó en incubación a 37 °C por 24 h.

La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción con cristal violeta.

- ✓ El medio de cultivo se retiró y se dejó secar al aire. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma Aldrich, USA) por 15 min.
- ✓ Se retiró el glutaraldehído y se dejó secar al aire.
- ✓ Las células fueron teñidas con cristal violeta al 0.1 % (Sigma Aldrich, USA) por 20 min. con agitación constante. El cristal violeta fue retirado.
- ✓ Se lavo con agua destilada. Posteriormente se lavó con agua de la llave y se enjuago hasta que no existió exceso de colorante. Se dejó secar la placa al aire.
- ✓ Posteriormente se agregó 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético (Sigma Aldrich, USA) al 10 % por 20 min. con agitación constante.
- ✓ La absorbancia fue medida a 570 nm en el espectrofotómetro (Image Tecan Spectra).
- ✓ Los resultados fueron comparados de los grupos estimulados con su respectivo control.

#### **Determinación de la IC<sub>50</sub> matemática**

- ✓ La IC<sub>50</sub> fue determinada con los datos obtenidos en el espectrofotómetro (Image Tecan Spectra).

- ✓ Los datos fueron convertidos en porcentaje celular y correlacionados con las concentraciones en  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de extracto acuoso de *agave Pitzometl*.
- ✓ Se utilizó un modelo de regresión lineal calculando la ecuación de la recta en cada ensayo. Se realizó una interpolación para calcular la disminución del 50 % de la población celular ( $\text{IC}_{50}$ ).

### Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales

- ✓ En una caja de cultivo de 96 pozos (Corning, USA) fueron sembradas 7500 células por pozo con 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 al 5 % de CNS de la línea celular HeLa, se incubó a 37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ , durante 24 h.
- ✓ En los pozos se agregó la concentración obtenida anteriormente de  $\text{IC}_{50}$  del *agave Pitzometl* en medio de cultivo fresco. A los controles únicamente se les cambió de medio de cultivo RPMI-1640. Se incubó a 37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ , durante 24 h.
- ✓ Una hora antes de cumplir las 24 h, se realizó un cambio de medio por medio fresco al 1 % de Tritón X-100 al control positivo. Condición que se mantuvo por 1 h.

Cumplidas las 24 h se recuperó el medio de cultivo de los distintos tratamientos. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm (HermLe Z200A) durante 10 min.

- ✓ Se transfirieron 40  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada uno de los tratamientos a un pozo de una placa de 96 pozos por separado. Se añadió 40  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción del estuche de ensayo citotóxico no radioactivo (Kit Nonradiative Cytotoxicity assay, 250  $\mu\text{L}$  de solución catalítica y 11.25 mL de solución de marcado) a cada pozo. Se incubó durante 20 min. Protegido de la luz a temperatura ambiente.
- ✓ La absorbancia fue leída en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm.
  - ✓ El porcentaje de citotoxicidad fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \left[ \frac{\text{muestra-control negativo}}{\text{control positivo-control negativo}} \right] \times 100$$

### **Ensayo de necrosis por Incorporación de Ioduro de propidio**

- ✓ Se sembraron 50 000 células por pozo en una caja de cultivo de 24 pozos (Corning, USA) con 500  $\mu$ L de medio RPMI-1640 al 5 % de CNS de la línea celular, fue incubada a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 24 h.
- ✓ En los pozos fue colocada la concentración obtenida anteriormente de IC<sub>50</sub> del *agave Pitzometl* en medio de cultivo fresco. Se realizó el cambio respectivo a los controles y se incubó a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 24 h.
- ✓ Se retiró el sobrenadante de 3 pozos por cada una de las condiciones. Se agregó 500  $\mu$ L de verseno y se despegaron las células, las cuales fueron colocados en tubos para citometría y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min.
- ✓ El verseno fue retirado y se resuspendió el botón celular con 500  $\mu$ L de PBS (Sigma Aldrich, USA).
- ✓ A cada uno de los tubos se le agregó 5  $\mu$ L de Ioduro de propidio y fue leído por citometría de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A).

### **Determinación de la condensación de la cromatina a través de la tinción con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)**

- ✓ Cinco pequeños cubreobjetos fueron colocados en las cajas petri a utilizar y esterilizados a 240 °C durante 1 h.
- ✓ Por cada caja se sembraron 500 000 células en 5 mL de RPMI-1640 teniendo cuidado de no levantar los cubreobjetos.
- ✓ Fueron incubados durante 24 h a 37 °C al 5 % de CO<sub>2</sub>.
- ✓ Las células fueron estimuladas con el control, camptotecina, vehículo y extracto respectivamente, incubados durante 24 h.
- ✓ En una placa de 24 pozos fueron colocados cada uno de los cubreobjetos.
- ✓ Se lavó suavemente con PBS durante 1min cada uno. Se fijaron las células con etanol al 70 % durante 15 min.
- ✓ El etanol fue retirado y se lavó nuevamente con PBS suavemente de 2 a 3 veces durante 1min. Cada uno.

- ✓ Se colocó cuidadosamente sobre el cubreobjetos 20  $\mu$ L de fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) formando un domo, se dejó reposar durante 5 min. (Protegido de la luz).
- ✓ Posteriormente fue lavado con PBS de 2-3 veces durante 1 min protegiendo de la luz
- ✓ En un portaobjetos se agregó el medio de montaje "anti-folding" y fueron colocados cada uno de los cubreobjetos. Fue sellado con barniz de uñas.
- ✓ Las muestras fueron leídas en el microscopio de epifluorescencia.

### **Evaluación del efecto del *agave Pitzometl* sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)**

- ✓ Se colectaron 20 mL de sangre periférica de un donador sano en tubos con EDTA. La sangre fué vertida en cuatro tubos cónicos de vidrio, 5 mL cada uno, los cuales contenían 5mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, E.U.A).
- ✓ Se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min. El plasma sanguíneo fue retirado y colectado el anillo de leucocitos. El paquete celular obtenido fue transferido de cada tubo a tubos limpios.
- ✓ Posteriormente fue resuspendido con 10 mL de PBS cada uno y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
- ✓ El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió con 5 mL de RPMI -1640 sin suero. El número celular fue determinado en una cámara de Neubauer.
- ✓ Los linfocitos fueron resuspendidos en 4 mL de PBS con 10  $\mu$ L de carboxifluoresceína e incubados durante 15 min protegidos de la luz a temperatura ambiente.
- ✓ Se lavaron con PBS al 5 % de solución buffer de fosfatos y fueron centrifugados a 1500 rpm.
- ✓ Se resuspendió en 4 mL de RPMI-1640 al 20 % de SFB.
- ✓ Para la activación con fitohemaglutinina los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos con una densidad de 1 000 000 células/mL de RPMI-1640

suplementado con 20 % de SFB y 25  $\mu$ L de fitohemaglutinina/mL (Micro Lab S.A., Méx.)

- ✓ Las células fueron tratadas con cada una de las condiciones, utilizando la IC<sub>50</sub> obtenida para línea celular HeLa.
- ✓ Las células fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200 000 células/pozo en un volumen de 200  $\mu$ L. Incubadas por 72 h hasta su evaluación.
- ✓ El sobrenadante fue retirado y las células fueron resuspendidas en 1 mL de verseno frío por 5 min, se centrifugaron y el verseno fue retirado.
- ✓ Las células fueron resuspendidas con 500  $\mu$ L de PBS (dos veces) para posteriormente ser leídas en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A.).

### **Análisis Estadístico**

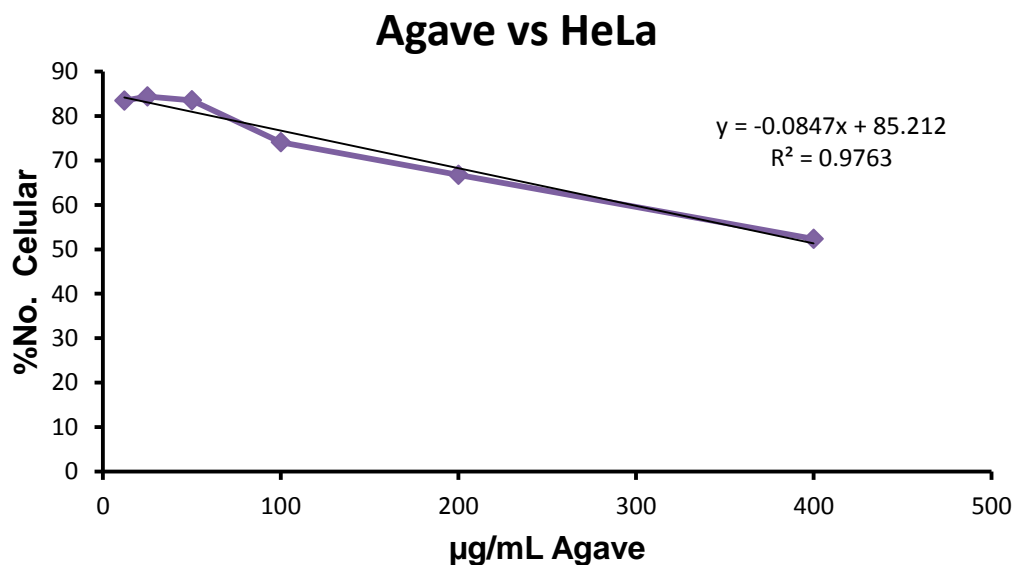
- ✓ Los datos experimentales fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010 para calcular su media y  $\pm$  desviación estándar.
- ✓ Fue aplicado un Análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias utilizando el programa SPSS 20.0 para Windows 7 seguido de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Determinación de la proliferación celular

Con el propósito de evaluar si el *agave Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de células tumorales provenientes de cérvix, cultivos de la línea tumoral HeLa fueron estimulados con diferentes concentraciones de *agave Pitzometl*.

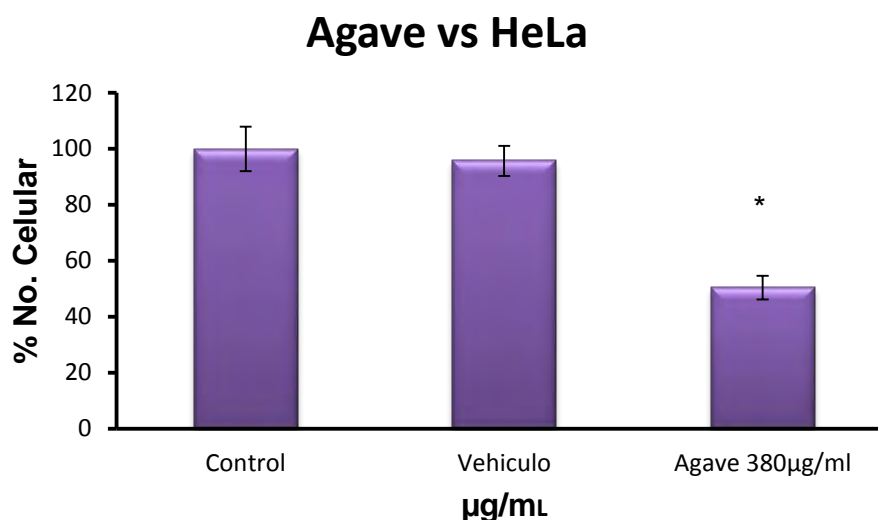
Con el propósito de evaluar si el *agave Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de células tumorales provenientes de cérvix, cultivos de la línea tumoral HeLa fueron estimulados con diferentes concentraciones de *agave Pitzometl* (Figura 8) y la concentración requerida para reducir en un 50 % el número celular ( $IC_{50}$ ) fue calculada.



**Fig. 8 Efecto antiproliferativo del agave Pitzometl en la línea de cáncer cervicouterino HeLa. Fueron sembradas en placas de 96 pozos (7500/pozo) y estimuladas con diferentes concentraciones de agave Pitzometl por 24 h, el número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con cristal violeta. La  $IC_{50}$  fue calculada mediante la linealización de los datos y con ayuda de la ecuación de la recta. El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.**

Los resultados obtenidos en la figura 8 indican que el extracto afecta el potencial proliferativo de las células HeLa de manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración el número celular decrece, también indica que el extracto presenta actividad antiproliferativa de células HeLa con una IC<sub>50</sub> de 380 µg/mL.

Con el propósito de confirmar la concentración de IC<sub>50</sub> calculada, cultivos de la línea celular HeLa fueron tratados con 380 µg/mL del extracto y el número celular fue determinado mediante la técnica de tinción con cristal violeta (Figura 9).

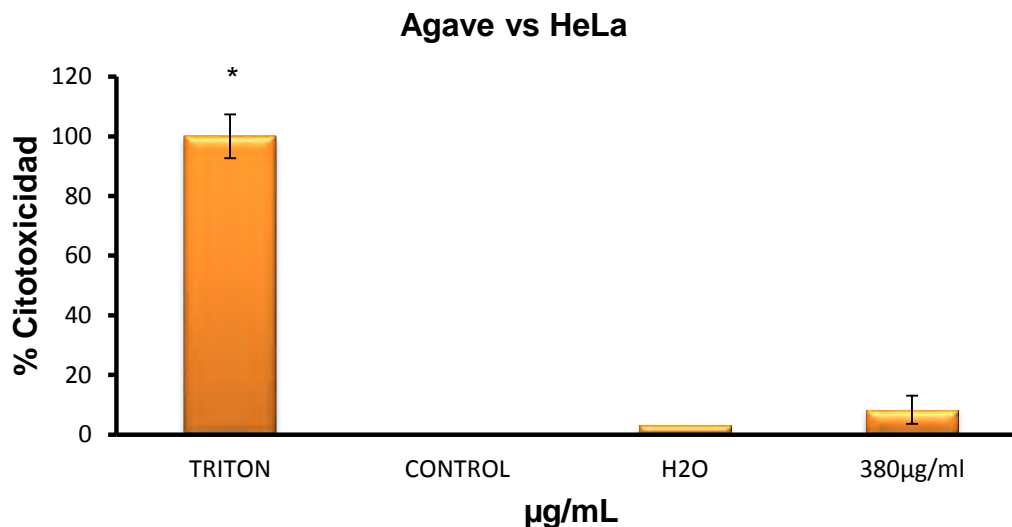


**Fig. 9 Confirmación del efecto antiproliferativo del agave *Pitzometl* sobre el potencial proliferativo de la línea celular HeLa. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h. de adherencia y tratadas con 380 µg/mL de agave *Pitzometl* por 24 h. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción con cristal violeta. La I indica la desviación estándar y el \* indica que estadísticamente existe diferencia significativa de los valores obtenidos. La ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (\*  $p < 0.05$  vs Agave). La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.**

Como se puede observar en la figura 9, la concentración de 380 µg/mL de extracto de *agave Pitzometl* decrece aproximadamente en un 50% el número celular, confirmando el valor de IC<sub>50</sub> calculada.

### 9.3 Ensayo de necrosis por liberación de LDH

Para poder evaluar si el *agave Pitzometl* presenta actividad citotóxica (necrosis) en las células tumorales, cultivos de la línea celular HeLa fueron tratados con 380 µg/mL de *agave Pitzometl* durante 24 h y la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes como un marcador de necrosis (Figura 10).



***Fig. 10 Ensayo de necrosis por liberación de LDH. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h. de adherencia y tratadas con agave pitzometl por 24 h. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción con cristal violeta. Se transfirieron 40 µL de sobrenadante de cada uno de los tratamientos a un pozo de una placa de 96 pozos por separado y se añadió 40 µL de mezcla de reacción del estuche del ensayo citotóxico posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas. La I indica la desviación estándar y el \* indica que estadísticamente existe diferencia significativa de los valores obtenidos. La ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (\*  $p < 0.05$  vs Agave). La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.***

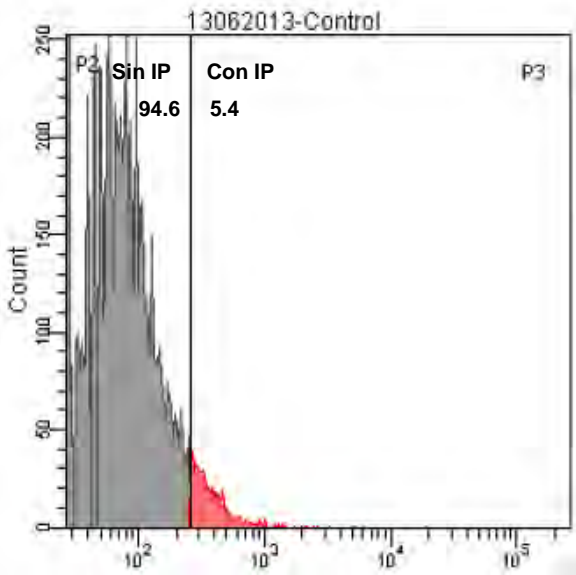
Como se puede apreciar en la figura 10, el extracto de *agave Pitzometl* presenta una baja actividad citotóxica (necrótica) en los cultivos de células HeLa (5.169 %), sugiriendo que este extracto es de nula o baja citotoxicidad.



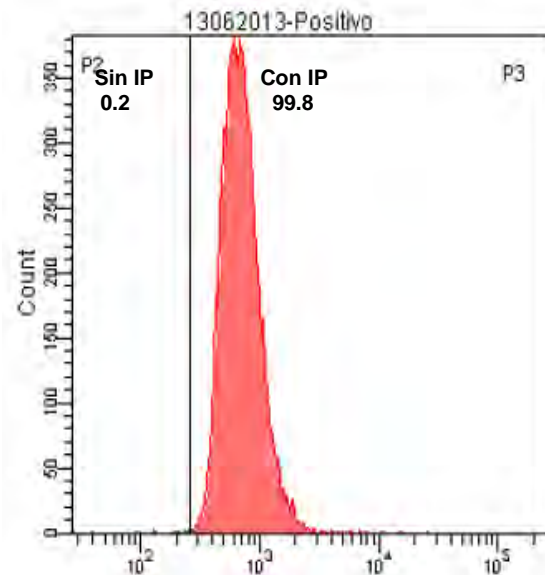
## 9.4 Ensayo de necrosis por incorporación de Ioduro de propidio

Con la intención de comprobar que el extracto de *agave Pitzometl* no es citotóxico (necrótico) en células HeLa, se utilizó otro método de muerte celular necrótica, el cual consiste en la incorporación celular de Ioduro de Propidio (IP), por lo que cultivos de células HeLa fueron tratados con 380  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto y las células que incorporaron IP fueron cuantificadas mediante citometría de flujo (Figura 11).

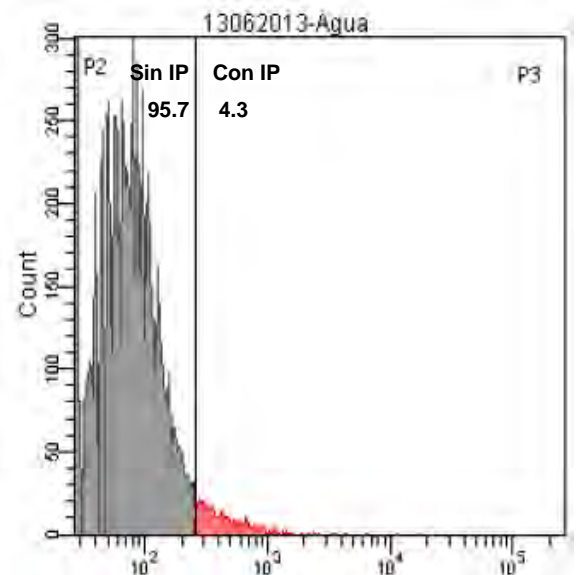
### Control



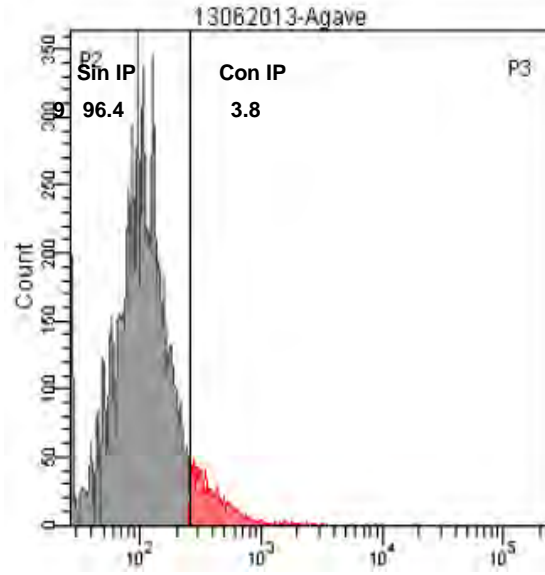
### Positivo (EtOH)



### Agua



### Agave Pitzometl

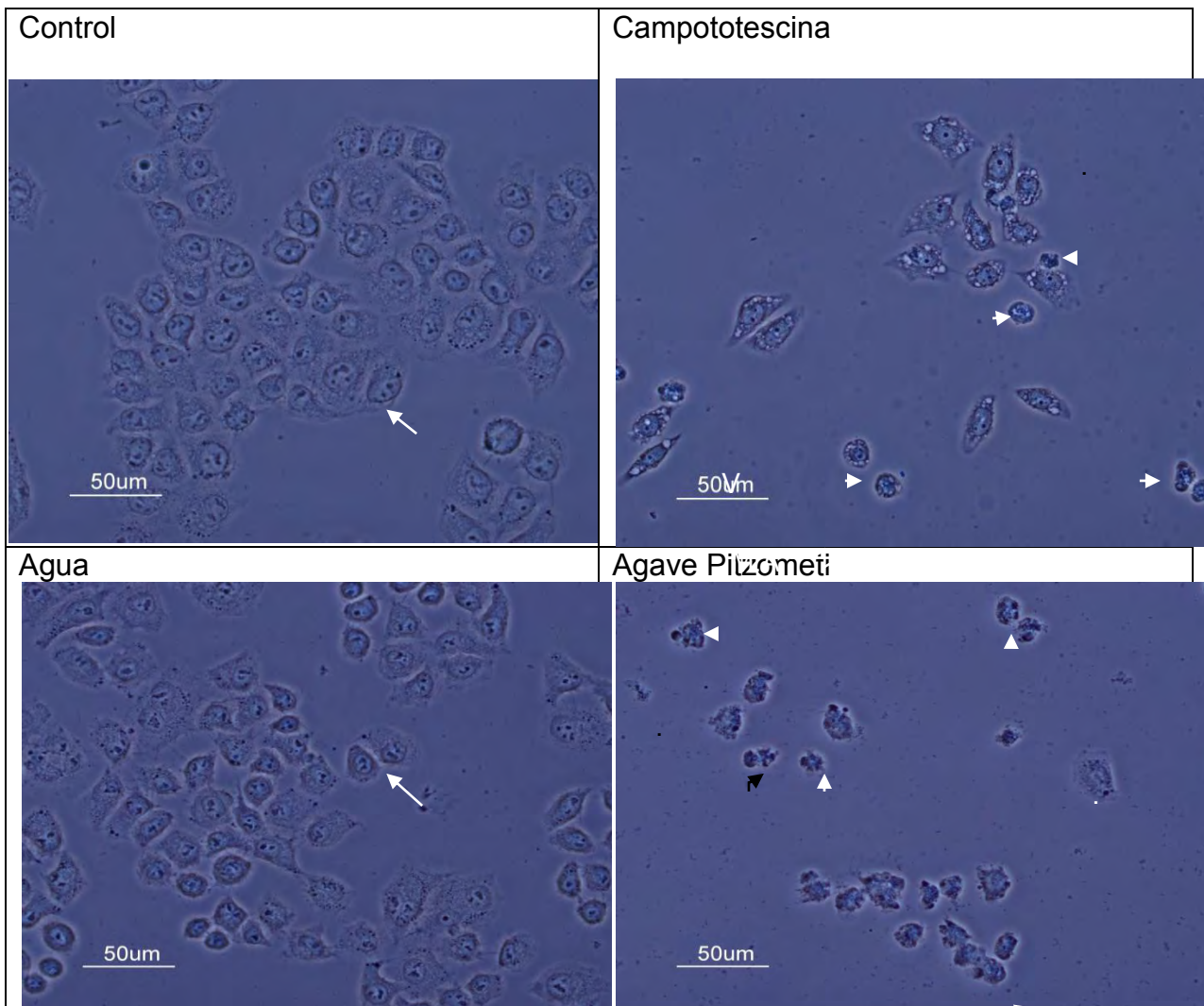


**Fig. 11. Incorporación de Ioduro de propidio. Las células fueron cultivadas en cajas de 24 pozos (50 000 células/pozo) por 24 h. de adherencia y tratadas con agave pitzometl por 24 h. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción con cristal violeta. Posteriormente se incorporó el Ioduro de propidio y se leyeron las muestras mediante citometría de flujo. La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.**

Los resultados obtenidos indican que el extracto de *agave Pitzometl* induce una baja incorporación celular de IP en los cultivos de células HeLa (3.8 %), resultado similar al obtenido con la actividad de la enzima LDH, confirmando que dicho extracto no es citotóxico en cultivos de células HeLa en estas condiciones.

## 9.5 Efecto en la morfología celular y condensación de la cromatina

Para establecer si el extracto de *agave Pitzometl* afecta la morfología celular y nuclear de las células HeLa en cultivo, cultivos de la línea celular HeLa fueron sembrados en cubreobjetos y estimulados con 380 µg/mL de extracto por 24 h y, las células fueron fijadas con etanol al 70 % y teñidas con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para finalmente ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Figura 12 y 13).



**Fig 12. Micrografías ópticas con iluminación de contraste de fases. Células HeLa tratadas por 24 h con una concentración de 380 µg/mL del extracto acuoso de agave Pitzometl. En el control y en el vehículo se observan células con forma poliédrica, citoplasma extendido y núcleo de forma regular. Algunas células están en división (flechas). Las células tratadas con camptotecina muestran cambios morfológicos como compactación citoplasmática y nuclear, indicando cuerpos apoptóticos (cabezas de flecha). Las células tratadas con el extracto de mango presentan una fuerte compactación celular (cabezas de flecha).**

Las células control y las tratadas con el vehículo, muestran la clásica morfología poliédrica para las células HeLa. Estas células poseen un citoplasma extendido y mantienen un estrecho contacto entre ellas. El núcleo posee una morfología regular con uno o varios nucléolos grandes con respecto al tamaño nuclear indicando que los nucléolos son funcionales. Cuando las células son tratadas con el inductor de apoptosis camptotecina, algunas células se ven afectadas y su morfología cambia, mostrando una contracción citoplasmática evidenciada por la separación entre ellas y la forma esférica. Algunas células muestran alteraciones más avanzadas en forma de claros cuerpos apoptóticos. Los cultivos tratados con el extracto de mango presentan diferentes fases del proceso apoptótico, algunas células empiezan a perder la extensión citoplasmática mientras que otras expresan una fuerte compactación celular que indica la formación de cuerpos apoptóticos (figura 12).

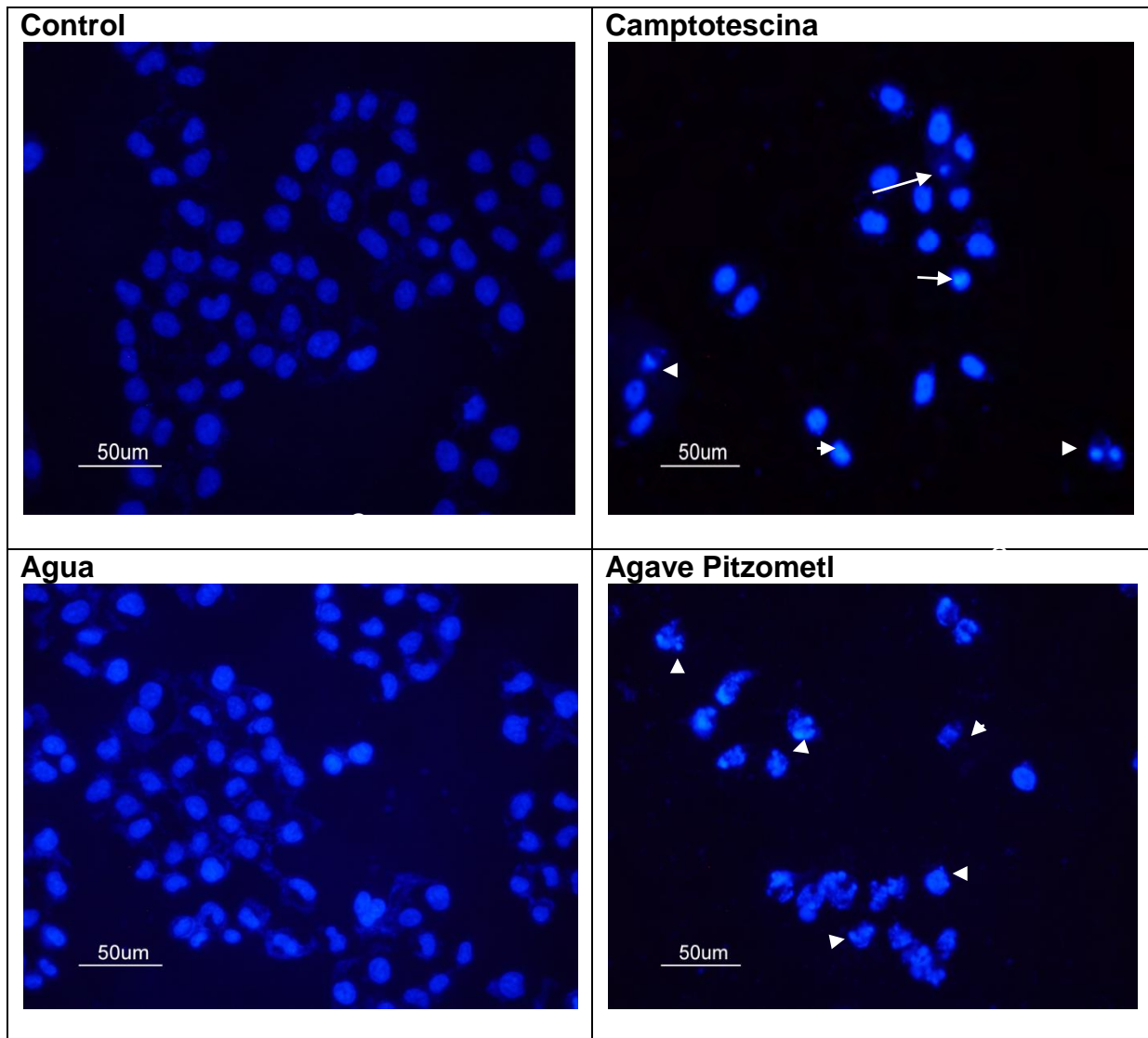
### **Condensación y/o fragmentación de la cromatina nuclear inducido por el extracto acuoso de *agave Pitzometl* en células de cáncer cérvicouterino HeLa**

Con el fin de establecer los efectos del extracto acuoso de *agave Pitzometl* sobre la cromatina de células HeLa, los cultivos fueron estimulados con 380 µg/mL del extracto por 24 h y posteriormente los núcleos fueron teñidos con el colorante fluorescente DAPI, que es específico para ADN. Las células fueron evaluadas y fotografiadas con un microscopio de epifluorescencia.

Las células control y las tratadas con el vehículo, presentan un núcleo con cromatina laxa y compacta distribuida en el núcleo. Las regiones con intensa tinción corresponden a cromatina compacta. En ambos casos los núcleos presentan tamaños similares. Esta tinción también permite observar el arreglo de la cromatina en forma de cromosomas en aquellas células que están en diferentes fases del proceso de división (flechas figura 13).

Los núcleos de las células tratadas con la camptotecina presentan cambios que evidencian una compactación de la cromatina, la cual se puede apreciar por la disminución del tamaño nuclear. También se pueden observar algunos cuerpos

apoptóticos que indican la fragmentación de la cromatina (cabeza de flecha figura 13). El tratamiento con el extracto provoca una reducción nuclear y una fuerte compactación de la cromatina, que está evidenciada por el incremento de la intensidad de la fluorescencia. Tras este tratamiento, la cromatina se fragmenta dando origen a los cuerpos apoptóticos (cabezas de flecha figura 13).



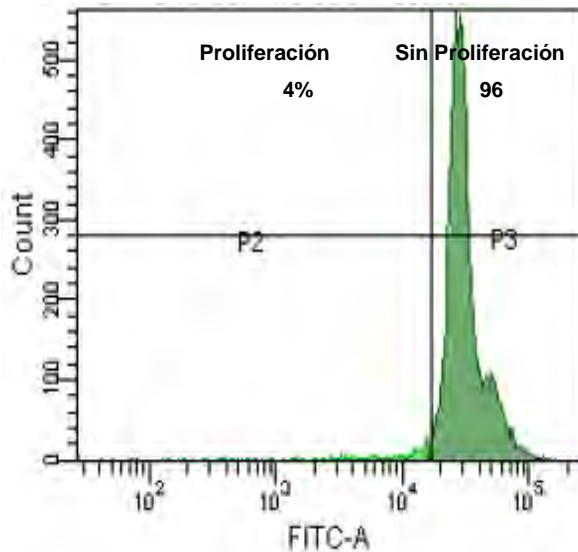
**Fig 13. Micrografía de fluorescencia. Células HeLa teñidas con DAPI. Los núcleos de las células control y del vehículo poseen cromatina distribuida en el nucleoplasma. Algunas presentan figuras mitóticas (flechas). Las células tratadas con camptotecina y con el extracto inducen la condensación y/o fragmentación de la cromatina (cabezas de flecha).**

Los resultados obtenidos en la figura 13, indican que el extracto acuoso de *agave Pitzometl* provoca en las células de cáncer cérvicouterino un proceso de muerte apoptótica.

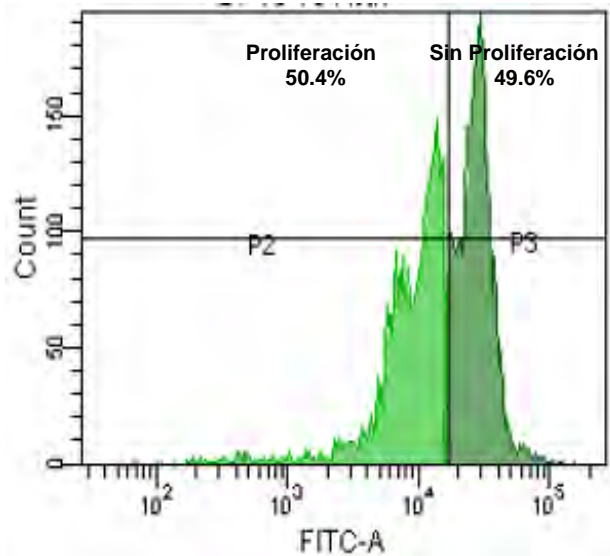
## 9.6 Actividad antiproliferativa en células no tumorales

Con la intención de establecer si el *agave Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas humanas fueron marcados con carboxifluoresceína (CSFE) y tratados con 380  $\mu\text{g/mL}$  de agave durante 72 h, el porcentaje de proliferación celular fue determinado por citometría de flujo. (Fig. 14)

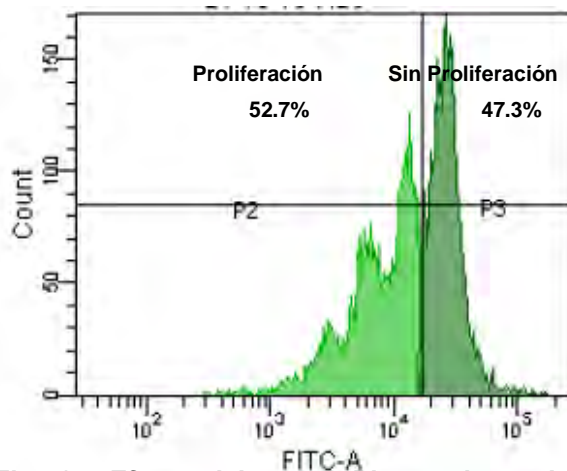
**Sin PHA**



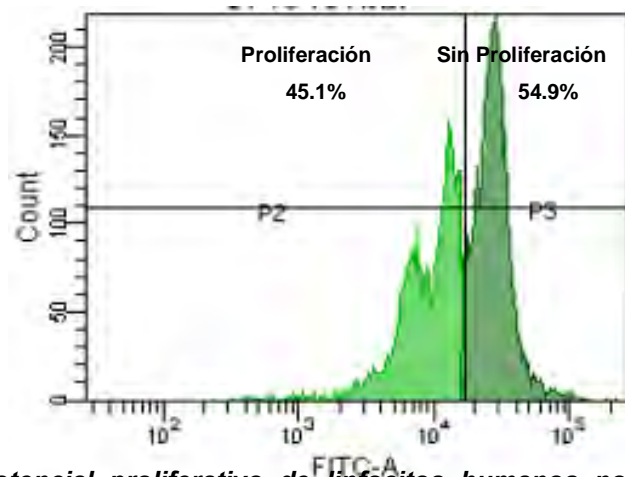
**Con PHA**



**Agua**



**Agave**



**Fig. 14.** Efecto del agave *Pitzometl* en el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. Los cultivos de linfocitos fueron marcados con Carboxifluoresceína (CSFE). Para activar a los linfocitos se le agregó 25  $\mu\text{L}$  de fitohemaglutinina (PHA). Sin PHA: Linfocitos sin activar. Con PHA: Linfocitos activados, marcados con CSFE y con PHA. Agua: Linfocitos marcados con CSFE, PHA, usando como vehículo agua. Agave: Linfocitos marcados CSFE, PHA y estimulados con 380  $\mu\text{g/mL}$  de agave *Pitzometl*. La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.

	Con PHA	Agua	Agave Pitzometl
%Degr. CSFE	50.4	52.7	45.1
Proliferación	100	104.5	89.4

Tabla 1. Se muestran los valores obtenidos por citometría de flujo tomando a los linfocitos con fitohemaglutinina (PHA) como máximo de proliferación.

Como se puede observar en la figura 14, el bajo efecto (11 %) del extracto de agave Pitzometl sobre el potencial proliferativo de las células linfocíticas sugiere que este extracto no afecta el potencial proliferativo de dichas células en estas condiciones.

### 9.7 Actividad citotóxica en células no tumorales

Para determinar que el decremento inducido por el *agave Pitzometl* en los cultivos de células no tumorales es llevado a cabo mediante un posible efecto citotóxico, cultivos de linfocitos fueron inducidos con 380  $\mu$ /mL de extracto y la actividad de la enzima LDH fue determinada en los sobrenadantes de la misma manera como se determinó para las células tumorales (Fig.15).

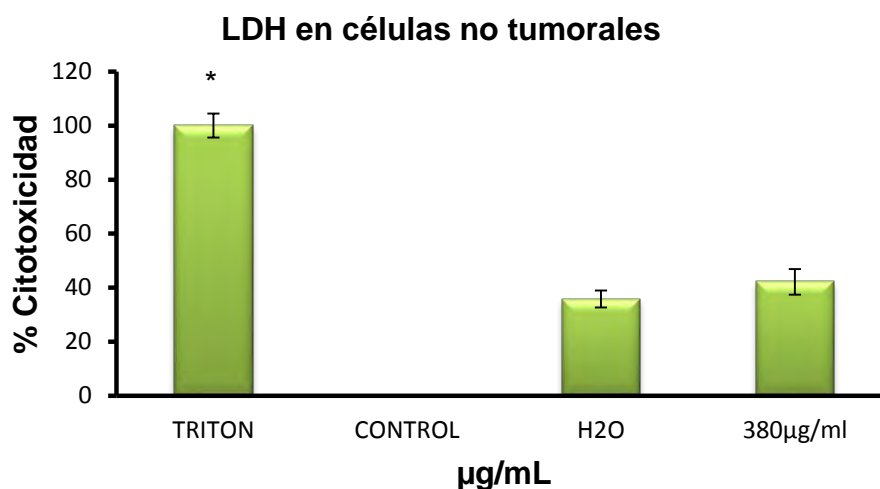


Fig. 15 Actividad en LDH en células no tumorales. Se transfirieron 40  $\mu$ L de sobrenadante de cada uno de los tratamientos a un pozo de una placa de 96 pozos por separado y se añadió 40  $\mu$ L de mezcla de reacción del estuche del ensayo citotóxico (Kit Nonradiactive Cytotoxicity assay, 250  $\mu$ L de solución



*catalítica y 11.25 mL de solución de marcado) posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas. La I indica la desviación estándar y el \* indica que estadísticamente existe diferencia significativa de los valores obtenidos. La ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (\*  $p < 0.05$  vs Agave). La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.*

Los resultados obtenidos muestran que los sobrenadantes presentan una actividad de LDH del 6.366 %, indicando que la actividad antiproliferativa de este extracto no genera daño en la membrana plasmática, sugiriendo que el extracto de agave *Pitzometl* no es no es citotóxico para las células linfocíticas en estas condiciones.

## 10 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cáncer es una enfermedad compleja que surge por alteraciones genéticas que modifican las diversas funciones celulares como proliferación, muerte celular programada y envejecimiento, las que, en última instancia, controlan el número de células de una población.

El cáncer cervicouterino se encuentra entre los tipos de cáncer femeninos de mayor importancia a nivel mundial. El reporte por parte del INEGI indica un total de 4 500 defunciones anuales lo que representa un gran problema de salud.

Las opciones de tratamiento para el cáncer cervicouterino dependen principalmente de la etapa del cáncer. Los tres tipos principales de tratamiento son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Algunas veces el mejor plan de tratamiento incluye dos de estos métodos o más.

No obstante el éxito de las terapias aplicadas para el tratamiento del cáncer, éstas resultan ser ineficientes en pacientes terminales, de alto costo, agresivas y con fuertes efectos colaterales, generando la necesidad de buscar o implementar nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad. Al respecto, en la literatura se ha descrito una diversidad de compuestos y extractos naturales con actividades biológicas diversas, destacando la actividad antitumoral.

Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina tradicional. Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país.

Los estudios antitumorales realizados con la familia Agavaceae son escasos, en el caso particular del *agave Pitzometl* los resultados demuestran que éste presenta actividad antiproliferativa en células tumorales humanas de cáncer cervicouterino con una IC<sub>50</sub> de 380 µg/mL. La escasa información sobre este agave en otras líneas celulares limita su análisis general.

No obstante se han encontrado estudios del *Agave lechugilla Torr* el cual fue utilizado en líneas celulares de mama y cáncer cervicouterino obteniendo una concentración inhibitoria mínima para la línea de cáncer cervicouterino HeLa de 89 µg/mL. Sin embargo, la técnica utilizada para determinar su actividad antiproliferativa fue realizada mediante la reducción de la sal de tetrazolium, técnica que objetivamente mide la viabilidad celular mediante la actividad mitocondrial, por lo que no se puede comparar con las concentraciones obtenidas en nuestro trabajo, ya que la técnica de cristal violeta evalúa el número celular no discrimina entre vivas y muertas.

En otro estudio se encontró que el *Agave americana* usado tradicionalmente para tratar la presión alta cuando se encuentra concentrado tiene actividad antibacterial, y los extractos de la planta de agave tienen efectos antiinflamatorios y antitumorales. Las hojas de *Agave americana* fueron secadas y extraídas con metanol con un aparato soxhlet a las cuales se les determinó la concentración inhibitoria en células de cáncer de mama y de cáncer de riñón obteniendo una concentración de 826.1 µg/mL y 8.455 µg/mL respectivamente.

Lo que nos demuestra que existen diferentes tipos de agave con actividad antitumoral y que ya están siendo probados en diferentes tipos de línea celular. En el presente estudio además de comprobar la actividad antiproliferativa del *agave Pitzometl* se determinó su efecto citotóxico y apoptótico en la línea celular HeLa así como en linfocitos de sangre periférica humana.

Actualmente el principio de acción de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula tumoral en comparación con el de las célula sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no tumorales que crecen y se dividen rápidamente como lo son los de la sangre. Además de presentar una alta actividad necrótica, generando los múltiples efectos secundarios como fatiga, náuseas, vómito, caída de cabello, lesiones en la boca y dolor, de tal manera que en pacientes con cáncer avanzado o metastásico, no solo los tratamientos quimioterapéuticos resultan ser ineficientes, sino que además, los efectos colaterales resultan ser tan significativos,

que afectan la calidad de vida del paciente, al grado de llevarlo a la muerte. Por ello la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa de nula o baja citotoxicidad es necesaria.

De esta manera en el presente trabajo se evaluó la actividad necrótica y antiproliferativa en células de CaCu en la línea tumoral HeLa, y no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana) mediante la técnica de actividad de la LDH e incorporación de Ioduro de propidio. Los resultados establecen que el *agave Pitzometl* genera nula o baja actividad necrótica para células de CaCu y para células no tumorales, ya que la principal característica de la muerte celular necrótica es la pérdida de la integridad de la membrana y en este caso no se presenta.

Se evaluó el efecto sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana. El *agave Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas únicamente en un 10.6 %. Lo cual nos demuestra una ventaja significativa ya que la cantidad de células linfocíticas eliminadas es mínima comparada con las células tumorales. Por lo tanto al no generar necrosis en células de CaCu ni en linfocitos, este extracto presenta una relevancia en su mecanismo de acción con respecto a los quimioterapéuticos cuyo mecanismo de acción está basado en la citotoxicidad.

De igual manera se ha descrito que el mecanismo de la mayoría de los quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento contra el cáncer, inducen a la célula a una muerte celular por necrosis, la cual tiene el inconveniente de inducir una fuerte reacción inflamatoria, que es directamente proporcional a la cantidad de células dañadas pudiendo ir desde una inflamación local, fiebre y malestar hasta la anafilaxia. Por lo tanto, la necesidad de encontrar compuestos que induzcan a las células a una muerte que no provoque una respuesta inflamatoria es obligada.

Es conocido que las células normales del cuerpo humano son eliminadas mediante diferentes mecanismos de muerte programada, destacándose la apoptosis, la cual elimina a las células de una manera silenciosa sin generar una respuesta inflamatoria, se caracteriza por los cambios en la morfología celular, la condensación de la cromatina y por la activación de caspasas entre otras.

Se demostró que el *agave Pitzometl* provocó en las células tumorales HeLa una reducción del citoplasma, forma esférica, de tamaño reducido, fragmentación nuclear, núcleos compactados con la cromatina fragmentada, formación de vesículas y la formación de cuerpos apoptóticos, estos cambios morfológicos son característicos de la apoptosis. Cabe mencionar que hace falta caracterizar de forma precisa la vía de señalización que lleva a la activación de la apoptosis. Para ello sería conveniente la evaluación de la activación de la caspasa 6 y caspasa 9, u otras proteínas proapoptóticas o antiapoptocias tanto en células tumorales como en no tumorales.

Estos resultados en conjunto, establecen que el *agave Pitzometl* presenta actividad antiproliferativa en células tumorales y no tumorales sin causar una muerte necrótica, induciendo a las células tumorales a una muerte apoptótica, haciendo de este un extracto ideal para continuar su estudio. Se recomienda realizar la separación de cada uno de los componentes del *agave Pitzometl* y de esta manera al ya estar confirmada su actividad, evaluar cual es el o los compuestos que la ejerce y así mejorar su efectividad.

## 11. CONCLUSIONES

- El extracto de *agave Pitzometl* afecta el potencial proliferativo de manera dosis dependiente en la línea celular HeLa, con una IC<sub>50</sub> de 380 µg/mL a 24 horas de tratamiento.
- Presenta un bajo efecto citotóxico determinado por la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (5.169 %) y la incorporación celular de Ioduro de propidio (3.8 %).
- El extracto acuoso de *agave Pitzometl* induce a las células HeLa a expresar características morfológicas propias de células apoptóticas.
- Afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos de sangre periférica en un 10.6 % sin inducir necrosis en 72 horas de tratamiento.

## 12. REFERENCIAS

1. Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer. [Internet] Aguascalientes. Instituto Nacional de Estadística y Geografía; [Última actualización **2014**; citado 2014 Marzo 31]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf?s=inegi&c=2900&ep=149>
2. Lira H. Análisis de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México. **2001**.
3. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. [Internet] Chiapas. Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas; [Última actualización **2012**; citado 2014, Marzo 31]. Disponible en: [http://www.cirpas-inifap.gob.mx/publi\\_cirps/agavechis.pdf](http://www.cirpas-inifap.gob.mx/publi_cirps/agavechis.pdf)
4. Ramos F, Oraday A, Rivas C, Verde M, Cruz D. Cytotoxic activity of Agave lechuguilla Torr. Afr. J. Biotechnol. **2012**;11:12229-12231.
5. Anajwala C, Patel M, Dakhara L, Jariwala K. In vitro cytotoxicity study of Agave americana, strychnos Nuxvomica and Areca catechuextracts using MCF-7 cell line. J. Adv. Pharm. Tech. Res. **2010**; 1: 245-252.
6. Salas F. Aspectos generales de la germinación y establecimiento de las plántulas de Agave marmorata roezl. [Servicio Social]. Valle de Tehuacan Puebla, Universidad Autónoma Metropolitana, Noviembre **2002**.
7. Biblioteca digital medicina tradicional mexicana. [Internet]. México. Universidad Nacional Autónoma de México; [Última actualización **2009**; citado 2012 Septiembre 6] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>

8. Rojas M. Tratado de medicina tradicional mexicana Vol. I. 3<sup>a</sup> ed. México. Tlahui. **2009**.
9. Waizel JB. Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria. México. Instituto Politécnico Nacional. **2006**.
10. Shah B, Seth A. Textbook of pharmacognosy and phytochemistry. Haryana. Elsevier. **2010**: 45-53, 134-150.
11. Hanson BA. Understanding medicinal plants. Their chemistry and therapeutic action. New York. The Haworth Herbal Press. **2005**.
12. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, 1<sup>a</sup> ed. Bogotá. Convenio Andrés Bello. **2000**.
13. Lincoln T, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. Plant physiology. 4th edn. Sinauer Associates, Inc. 2006: capítulo 13.
14. Ocampo R, Ríos L, Betancur L, Ocampo M. Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos. Universidad de Caldas. **2008**.
15. Mohrig J, Noring C, Schatz P. Techniques in organic chemistry. 2nd ed. New York. W.H. Freeman and company. **2006**.
16. Primo E. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Barcelona. Reverté. **2007**
17. El agave. [Internet]. México. Academia Mexicana del Tequila A.C [Última actualización **2001**; citado 2012 Septiembre 09]. Disponible en: <http://acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html>
18. Instituto de Biología. [Internet]. México UNAM. Agave marmorata Roetzl IBUNAM:MEXU:AGA873268 UNIBIO: Colecciones Biológicas. [Última actualización 2010; citado 2012 Septiembre 09]. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA873268>
19. Reyes S. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas Puebla. 1<sup>a</sup> ed. México. Instituto Nacional de Ecología, **2000**.



20. Abascal B. Propagación Vegetativa y Germinativa de *Agave marmorata* roezl. [Tesis]. México. Universidad Autónoma Metropolitana. **2003**.
21. Alonso P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer cérvico-uterino: diagnóstico, prevención y control. 5ª ed. México DF. Médica Panamericana. **2000**.
22. Gonzales M, Ordoñez A. Oncología clínica. 1ª ed. Madrid. McGraw Hill. **1992**.
23. Bowen I, Bowen M. Programmed cell death in tumor and tissues. 2<sup>nd</sup> edn. London. Chapman and Hall. **1990**.
24. Organización Mundial de la Salud. [Internet] Centro de prensa de la OMS. [Última actualización **2013**; citado 2013 Septiembre 06]. Disponible en: [http://search.who.int/search?q=cancer&ie=utf8&site=default\\_collection&client=\\_es\\_r&proxystylesheet=\\_es\\_r&output=xml\\_no\\_dtd&oe=utf8](http://search.who.int/search?q=cancer&ie=utf8&site=default_collection&client=_es_r&proxystylesheet=_es_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8)
25. Becker W, Kleinsmith L. El mundo de la célula. 6ª ed. México DF. Pearson Edison Wesley. **2007**.
26. Alberts B, Bray J, Lewis M, Raff K. Molecular biology of the cell. 1<sup>st</sup> edn. New York. Garland Publishing Inc. **1994**.
27. Studzinski P. Cell growth and apoptosis. 1<sup>th</sup> edn. New York. Oxford University Press. **1995**.
28. Darnell J, Havey L, Baltimore D. Biología molecular de la célula. 2ª ed. Nueva York. Scientific American Books. **1993**.
29. Lodsh H, Berk A, Zipusky S. Biología celular y molecular. 3ª ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. **2005**.
30. Mas O. Diagnósticos moleculares en medicina. 1ª ed. México DF. Manual Moderno. **2004**.
31. Mesa V, Lomanto L, Ortiz O. El ciclo celular. Med. UNAB. **2003**; 16: 21-29.

32. Bolsover R, Hyams S, Shephard A, White A, Widemann G. *Biología celular*. 1ª ed. Zaragoza. Acribia Editorial. **2008**.
33. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*. **1998**; 396: 119-122.
34. Galluzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny V, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. **2012**; 19: 107-120.
35. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. **1972**; 26:239-257.
36. Lewin B. *Genes*. 5ª ed. Oxford. McGraw-Hill. **2000**.
37. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez P, Anadon R, Saez F. *Biología celular*. 3ª ed. Madrid. McGraw Hill. **2007**.
38. Karp G. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*. 6ª ed. México. McGraw Hill. **2011**.
39. Lazcano E, Ruiz P, Hernández M. *Cáncer cervicouterino: Diagnostico, prevención y control*. 2ª ed. México. Medica Panamericana. **2005**.
40. Eifel P, Berek J. *Cancer of cervix, vaginal and vulva*, 1<sup>st</sup> edn. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams. **2001**.
41. Zaldivar G, Avila J, Molina F, Vega G, Sosa C, Lloret M. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Rev. Chilena obstetricia ginecológica*. **2012**; 77: 315-321.
42. Pardo J. *Anatomía, patología general y especial de las neoplasias*. 3ª ed. Madrid. Científico-Médica. **1998**.
43. Hebner C, Laimins A. Human papillomaviruses: basics mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology*. **2006**; 16: 83-97.

44. Zaldivar G, Àvila J, Molina F, Vega G, Sosa C Lioret M. Càncer cervicouterino y virus del papiloma humano. Revista chilena obstétrica ginecológica. **2012**; 77:315-321.
45. Comisión nacional de càncer cèrvico-uterino. Diagnòsticos y tratamiento càncer cèrvico-uterino. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud, **2004**.
46. Noriega G, Noriega L. El tratamiento actual del càncer cervicouterino. Ginecología y Obstetricia de Mèxico. **2008**; 76: 131-139.
47. National Cancer Institute. [Internet]. National Institutes of Health. USA. [Ultima actualizaci3n 2013; citado 2013 Septiembre 20] Disponible en: <http://www.cancer.gov/>
48. Sonnenschein, C. Soto, A. M. The society of cells: cancer and control of cell proliferation, 1<sup>st</sup> edn. New York, Bios Scientific Publishers, **1999**.
49. Herrera C. Anatomía patol3gica: temas para enfermería. 1<sup>a</sup> ed. Mèxico DF. Ecimed. **2005**.
50. Disaia P, Creasman W. Clinical gynecologic oncology. 6<sup>th</sup> edn. Madrid. Mosby, Inc. An Elsevier Science imprint. **2002**.

### 13. Anexos

#### ☀ Medio de cultivo.

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO<sub>3</sub> (SIGMA, USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

#### ☀ Desactivación del suero.

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL para su mejor uso y manipulación.

#### ☀ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1L de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore)

con diámetro de poro de 22  $\mu\text{m}$ , la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

☀ Verseno.

Ésta solución se empleó para despegar las células tumorales HeLa y ViBo adherentes, y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g

NaCl (SIGMA, USA) 8 g

KCl ((SIGMA, USA) 0.4 g

Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza en autoclave a 20lbs durante 20 min.

☀ Solución cristal violeta (0.1 %).

Para preparar 500 mL de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g

Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 mL

Cristal violeta (SIGMA, USA) 1 g

☀ Colorante Cristal Violeta.

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.

☀ Glutaraldehído.

A 1.57mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

☀ Solución de ácido acético (10 %).

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 mL de agua bidestilada.