



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

**Efecto de extractos crudos de especies silvestres de
Sechium spp. (*S. chinantense* (Lira & Chiang) y *S.*
compositum (J.D. Smith) C. Jeffrey) y un híbrido H-
387-07-GISem, sobre la proliferación de líneas
leucémicas mieloides de ratón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

REYNALDO TIBURCIO FÉLIX

VO. BO.

DIRECTORA DE TESIS

BIÓL. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

VO. BO.

ASESOR INTERNO

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO



MÉXICO, D.F., FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

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

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la DGAPA, UNAM PAPIIT (IN225610), ICyTDF (PICSA10-156) y al proyecto: “Evaluación la actividad antitumoral de extractos crudos de *S. chinantlense* y *S. compositum* ubicados en el BANGeSe”, financiado por: EL GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN EN *Sechium edule* EN MÉXICO, A.C. y EL SISTEMA NACIONAL DE RECURSOS FITOGENÉTICO (SINAREFI-SNICS-SAGARPA).

A todas las personas que con su apoyo, trabajo y paciencia me han permitido ver llegar el término de este proyecto y que han sido fuente de aprendizaje para mí, en todos los aspectos de mi vida.

*En primer lugar quiero agradecer al **Dr. Edelmiro Santiago Osorio** por su confianza y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo a pesar de tantas inconsistencias de mi parte.*

*Debo un especial reconocimiento a mi amiga y directora de tesis la **Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez** por la paciencia y el tiempo que me brindó y por formarme en el área de la investigación.*

*También me complace agradecer a los miembros del jurado, **el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, la Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez, la Dra. Ma. Del Carmen García Rodríguez, la Dra. Ma. De Lourdes Mora García y el M. en C. Luis Sánchez Sánchez**, gracias por las observaciones, el tiempo, la dedicación y la comprensión que depositaron en este trabajo.*

*No puede olvidar a mis compañeros **el M. en C. Edgar Ledesma, M. en C. Yolanda Córdova, M. en C. Vaniamin Domínguez y al Biól. Oswaldo Silvestre** quienes además de apoyarme en lo académico me brindaron sus consejos y amistad durante la realización de esta tesis.*

*Con mucho aprecio a los **integrantes del laboratorio de hematopoyesis y leucemia**, donde además de trabajar con ellos, estuve disfrutando de su agradable compañía.*

A dios por darme vida para lograr esta meta aspirada, solo tú sabes el esfuerzo que he dado en mis días y en mis noches de soledad, guiándome con tu luz divina y por el camino correcto para no desmayar. Agradecido estoy Señor por llenar mi vida de bendiciones y por estar junto a mí cada momento de mi vida.

A mis padres Reynaldo Tiburcio y Natividad Félix por haberme cobijado en sus brazos desde el primer día de mi existencia, dándome así las fuerzas para seguir en mi camino y alcanzar este sueño anhelado, en este momento de alegría no dejo de pensar en su apoyo, confianza y amor, porque si hay algo que sé hacer bien es por ustedes. Les agradezco también por tantos años de apoyo, compañía y desvelos. Gracias por vivir conmigo cada sentimiento que expresa mi corazón. Gracias por recorrer juntos este sueño compartido, sin ustedes nada de esto tendría sentido. Dios los bendiga y les dé larga vida para poder retribuirles un poco de lo que me han dado. Este trabajo y esfuerzo son de ustedes. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Maribel, Hugo y Adriana que han sido un ejemplo a seguir, una fuente de buenos consejos y una gran fortaleza a lo largo de toda mi vida. Por enseñarme que todo lo que nos proponamos en la vida lo podemos lograr si trabajamos fuerte y continuamos con rectitud. El tener éxito hoy, es el resultado de tener una excelente familia, y eso son ustedes.

A mis amigos Alan Cortes, Érica Chávez, Elíceo Quisehuatl, Elizabeth Camacho, Karla Galicia, Magib Vásquez, Mariana Ladrón de Guevara, Itzel Morales, Oswaldo, Rocío Rivera, Guadalupe Gómez, Francisco Tercero, Viridiana Enríquez, Axel Luviano y Pedro Cardoso por tolerar mi carácter, por no dejarme caer en momentos difíciles, por escucharme y aconsejarme, por ser parte de esta aventura, por compartir su cariño, tiempo y vivencias. Estarán siempre en mi corazón por que en el tren de la vida soy un viajero y de ustedes un eterno compañero de viaje. Gracias por ser mis amigos, los quiero mucho.

A Ángeles Hernández por tu apoyo y consejos, gracias por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de tu vida. Gracias por estar a mi lado justo en el momento indicado. Te quiero mucho.

A todos mis profesores especialmente al I.Q. Genáro Altamirano, QFB Rocío Breceda, y al Biól José Cosme Agilar que además de hacerme un profesionalista me ofrecieron sus consejos para seguir con mi formación académica. Los estimo mucho.

*Muy cerca de mi ocaso, yo te bendigo, vida,
porque nunca me diste ni esperanza fallida,
ni trabajos injustos, ni pena inmerecida.*

*Porque veo al final de mi rudo camino
que yo fui el arquitecto de mi propio destino.*

*Que si extraje la miel o la hiel de las cosas,
fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas:
cuando planté rosales, coseché siempre rosas.*

*Cierto, a mis lozanías va a seguir el invierno:
¡más tú no me dijiste que mayo fuese eterno!*

*Hallé sin duda largas noches de mis penas;
más no me prometiste tú sólo noches buenas;
y en cambio tuve algunas santamente serenas...*

*Amé, fui amado, el sol acarició mi faz.
¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en paz.*

Amado Nervo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	
Hematopoyesis.....	3
Muerte Celular.....	7
Leucemia.....	9
Género <i>Sechium</i>	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
MÉTODO	
Obtención y preparación de extractos.....	18
Líneas Celulares.....	18
Cultivo Celular.....	19
Cultivo de CMN de médula ósea.....	19
Evaluación de la proliferación celular.....	20
Evaluación de la viabilidad.....	20
Evaluación de cuerpos apoptóticos.....	21
Manejo de datos	21

RESULTADOS

Objetivo 1.....	22
Objetivo 2.....	30
Objetivo 3.....	31
Objetivo 4.....	32
Objetivo 5.....	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÉNDICE I.....	55
APÉNDICE II.....	59

ABREVIATURAS

AGM	Aorta-Gónada-Mesonefros
ATCC	American Type Culture Collection
CE	Con espinas
CTH	Células Troncales Hematopoyéticas
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
dpc	Días post-coito
GISeM	Grupo Interdisciplinario en Investigación en <i>Sechium edule</i> en México
h	Horas
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico-uterino
IL-1	Interleucina-1
IC ₅₀	Concentración de inhibición de la proliferación al 50 %
IMDM	Iscove's Modified Dulbeco's Medium
J774	Línea leucémica macrofágica de ratón
L929	Línea de fibrosarcoma de pulmón de ratón
LT-CTH	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPS	Lipopolisacarido
min	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
P388	Línea leucémica macrofágica de ratón
SE	Sin espinas
SFB	Suero fetal bovino
ST-CTH	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo
var	Variedad
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
WEHI-3	Línea leucémica mielomonocítica de ratón

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se ha convertido en la primera causa de muerte a nivel mundial. La leucemia es el cáncer de la sangre y en México el 12.8 % de muertes por cáncer es provocado por algún tipo de leucemia. La quimioterapia, trasplante de médula ósea, terapia de diferenciación o bloqueadores de blancos moleculares, son las estrategias terapéuticas para tratar la leucemia, sin embargo todos tienen efectos secundarios incluyendo deterioro de la calidad de vida del paciente y generación de células tumorales resistentes a los agentes anticancerígenos, lo cual explica la supervivencia del 30 % a 5 años en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda. Por lo anterior sigue vigente la necesidad de tener nuevas alternativas terapéuticas y las plantas han sido de gran importancia como fuente de agentes anticancerígenos. Recientes estudios con extractos crudos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. se ha establecido que tienen actividad antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales P388, L929 y HeLa. Sin embargo se desconoce el efecto de extractos de otras especies silvestres del género *Sechium* sobre la proliferación de líneas leucémicas mieloides. En este estudio se evaluó el efecto de extractos crudos de *S. chinantlense* con espinas (CE), *S. chinantlense* sin espinas (SE), *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM sobre la proliferación de las líneas leucémicas mieloides de ratón: P388 y J774, así como en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón. Después de 72 h de cultivo, mediante la técnica de cristal violeta, se encontró que todos los extractos frenan la proliferación en forma dosis-dependiente, efecto que se conserva en cultivos in vitro de médula ósea normal. El decremento de la proliferación se acompaña por una reducción en la viabilidad de células leucémicas, pero no de células normales. La reducción de la viabilidad en las células leucémicas se correlaciona con la formación de cuerpos apoptóticos, un parámetro vigente para evaluar muerte por apoptosis. Lo anterior indica que los extractos de *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM frenan la proliferación de líneas leucémicas y también de células normales de médula ósea de ratón, pero sólo existe reducción de la viabilidad en células leucémicas con inducción a la formación de cuerpos apoptóticos. Por lo anterior se abre una nueva alternativa de investigación para resolver problemas hemato-oncológicos usando especies del género *Sechium*.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso a través del cual las células más primitivas hematopoyéticas proliferan y se diferencian dando lugar a los distintos tipos de células sanguíneas maduras. Este proceso es necesario para el buen funcionamiento del organismo debido a que las células presentes en la circulación, tienen un periodo de vida relativamente corto y mueren cumpliendo sus funciones, por ejemplo, los eritrocitos se encargan de transportar oxígeno, las plaquetas intervienen en el proceso de coagulación sanguínea o las células blancas como los granulocitos, monocitos y linfocitos participan en la defensa inmunológica del organismo (Zambrano *et al.*, 1999; Mayani *et al.*, 2007).

Las células hematopoyéticas se generan durante el desarrollo embrionario. En un modelo de ratón se inicia durante los 7–7.5 dpc (días post coito), a partir de las células mesodérmicas capaces de generar tanto células hematopoyéticas como endoteliales en los islotes sanguíneos del saco vitelino (Kyba *et al.*, 2002; Cumano *et al.*, 2007). Durante los 10-12 dpc se pueden detectar células troncales hematopoyéticas (CTH) en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) (Godin, *et al.*, 2005). Sin embargo, mientras el saco vitelino promueve la expansión de estas células y la generación de eritrocitos primitivos, la región AGM puede producir progenitores multilinajes, sin inducir su diferenciación. Por esta razón, en el 13 dpc las CTH deben migrar al hígado y al bazo fetal, donde existe una elevada actividad hematopoyética antes del nacimiento. En estos órganos ya se lleva a cabo la diferenciación mieloeritroide, sin embargo, en cuanto a las células linfoides, sólo se pueden generar células pertenecientes al linaje B (McGrath, 2005). Finalmente la actividad hematopoyética pasa a la médula ósea hacia el 15 dpc, siendo el principal sitio hematopoyético en el individuo después del nacimiento (Yorder, 2001; Cumano *et al.*, 2007). En las primeras semanas de vida, la médula ósea de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munkey *et al.*, 1998). Posteriormente, en la etapa adulta debido al incremento de las células adiposas en ciertas regiones de la médula, el proceso queda restringido fundamentalmente a la epífisis de los huesos largos

(fémur y húmero), así como en los huesos pélvicos, columna vertebral, cráneo y esternón (Hughes *et al.*, 1991; Bellantuono, 2004).

La hematopoyesis es un proceso que se lleva a cabo únicamente en órganos hematopoyéticos. En ellos las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente denominado microambiente hematopoyético, el cual consiste, en una estructura tridimensional, compuesto por diferentes tipos celulares (células del estroma) y sus productos (matriz extracelular, citocinas, colágena, etc.) los cuales, en conjunto, regulan la localización, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas (figura 1) (Yin *et al.*, 2006). La localización exacta de las CTH dentro de la médula ósea no es azarosa. La mayoría de estas células se localizan dentro de una región denominada endosteal, mientras que los progenitores comprometidos hacia un linaje determinado y las células maduras se distribuyen lejos de esta región, predominantemente en la región central de la médula ósea, cerca de los vasos sanguíneos (Mayani, 2009).

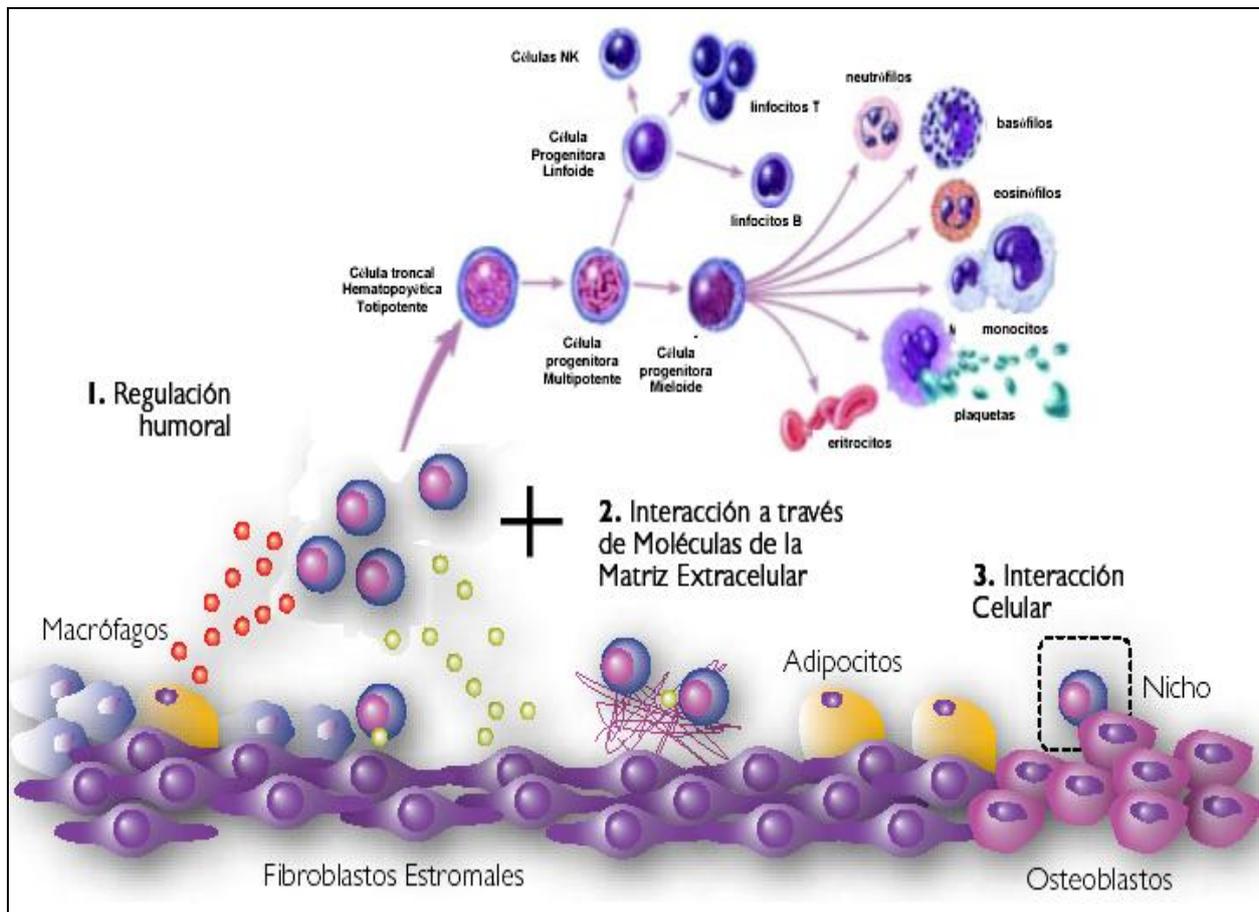


Figura 1. Microambiente hematopoyético (Tomado y modificado de Mayani, 2007).

Para su estudio el sistema hematopoyético ha sido dividido con base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que se generan. Según al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos. El primer compartimiento corresponde a las CTH, son las células sanguíneas más primitivas. Estas células a pesar de no distinguirse por su morfología, se definen mediante tres características: la auto-renovación, multipotencialidad y la capacidad de regenerar el tejido hematopoyético (Wognum *et al.* 2003). Las CTH corresponden de 0.01% a 0.005% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea. Sin embargo, a pesar de ser tan escasas son capaces de generar una gran cantidad de células maduras gracias a su potencial de proliferación. Se estima que a partir de una sola CTH se pueden producir 10^{13} células maduras *in vivo* y 35×10^6 *in vitro* (Metcalf, 2001). En ratones se han identificado dos tipos de poblaciones de CTH: LT-CTH y ST-CTH (célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo y célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo, respectivamente), las primeras tienen antígenos específicos tales como LIN^{-} , Kit^{+} , $Sca-1^{+}$, $CD34^{Lo}$, $FLK2^{Lo}$ y tiene la capacidad de sostener la hematopoyesis durante toda la vida del individuo. Las ST-CTH expresan los antígenos LIN^{-} Kit^{+} $Sca-1^{+}$ $CD34^{Hi}$ $FLK2^{Lo}$, esta población de células mantiene la hematopoyesis durante un corto periodo de vida (Sharpless *et al.*, 2007).

Conforme avanza el proceso de maduración las CTH dan origen al segundo compartimento de la jerarquía hematopoyética formado por las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Éstas forman una población celular muy heterogénea que constituye cerca del 0.3% del total de células presentes en médula ósea (Engelhardt *et al.*, 2002). Las CPH comparten ciertas características inmunofenóticas con las CTH tales como LIN^{-} KIT^{+} $SCA1^{+}$ $CD34^{Hi}$ pero las CPH expresan en mayor cantidad el receptor $FLK2^{Hi}$, sin embargo su comprometimiento permite la generación de progenitores mieloides común $C-KIT^{+}$ $IL7R-\alpha^{-}$ $CD34^{+}$ o al progenitor linfocítico común que expresa el $CD227$, $CD38$ y $CD45R\alpha$ (Civin *et al.*, 1993; Mayani, 2007).

Las CPH dan lugar a células precursoras hematopoyéticas que componen el tercer compartimento. Éstas son reconocibles por su morfología y a diferencia de los otros dos compartimentos anteriores, éstas células tienen un potencial de proliferación limitado y se encuentran comprometidas hacia un linaje específico. Las células precursoras constituyen más del 90% de las células hematopoyéticas residentes en médula ósea (Mayani *et al.*, 2007).

Finalmente, los precursores hematopoyéticos generan a las células sanguíneas maduras quienes representan el cuarto compartimento. Estas células son: eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas (figura 2) (Mayani *et al.*, 2007).

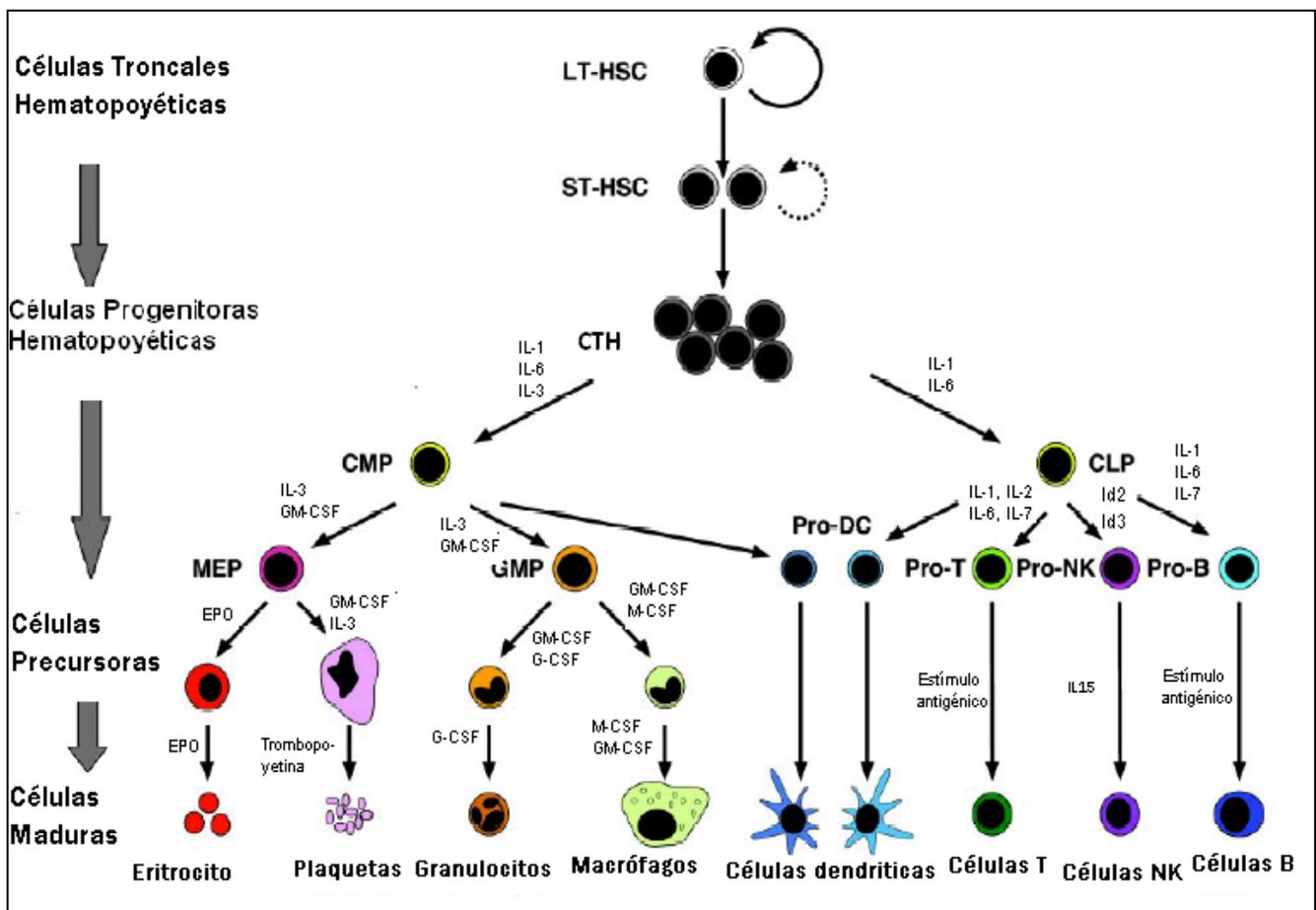


Figura 2. Cascada de proliferación y diferenciación celular (Tomado y modificado de Passegue *et al.*, 2003)

La viabilidad, autorenovación, proliferación, comprometimiento y diferenciación de las células troncales depende de factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Los primeros involucran a una variedad de moléculas reguladoras presentes en la célula de acuerdo con el tejido o linaje al que pertenece; los segundos, incluyen a todos los tipos celulares y sus productos que forman. En otras palabras, la función de las células troncales depende en última instancia de factores reguladores intrínsecos que son modulados por señales externas tales como citocinas (Mayani, 2009).

Muerte celular

En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis celular mantiene el estado de diferenciación de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación y su tiempo de vida, de acuerdo con las necesidades del organismo, eliminando aquellas que han cumplido sus funciones, o que están dañadas ya sea a nivel celular o genético. De esta manera la muerte celular toma un papel fundamental para el equilibrio fisiológico del organismo (Jiménez, 2003).

Existen diferentes tipos de muerte celular siendo más comunes la necrosis y la apoptosis. Aunque estos dos tipos de muerte tienen algunas características en común, presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica, de esta forma es posible identificar cada mecanismo de muerte celular (Dubin *et al.*, 2000)

La necrosis es un fenómeno degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, puede ser consecuencia de un trauma ambiental como temperaturas extremas, isquemia, daño mecánico y generalmente como respuesta a una lesión grave (Fink *et al.*, 2005). La necrosis se caracteriza morfológicamente por un aumento en el volumen celular, hinchazón de orgánulos, lisis de la membrana celular y la pérdida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular (Figura 3) induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Kroemer *et al.*, 2005).

El término de apoptosis es usado para describir la muerte celular programada, ya que desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias. La apoptosis no se da de forma aleatoria, sino que se trata de un proceso activo bien definido genéticamente,

en el que las células están destinadas a morir en un tiempo determinado (Jordan, 2003). Este proceso es dinámico en donde aparecen múltiples eventos en diferentes momentos, y puede ser activado por factores intrínsecos y extrínsecos. La apoptosis contribuye a dar forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autoreactivas, las células infectadas y las genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente dañina para el organismo. En los primeros estudios, la apoptosis fue descrita en base a características morfológicas que presentan las células (Alfaro *et al.*, 2000; Potten *et al.*, 2004).

Los cambios morfológicos que se producen mediante la apoptosis se pueden identificar mediante la microscopía óptica o electrónica. Uno de los eventos tempranos es la contracción celular ocasionando compactación de orgánulos y citoplasma más denso. También se observa picnosis, que es el resultado de la condensación de la cromatina. Posteriormente los orgánulos al igual que el material genético se encapsulan en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos (Figura 3). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células del sistema inmune natural, de esta manera no se genera una respuesta inflamatoria como en la necrosis (Jordan, 2003; Zalacain *et al.*, 2005; Fenech, 2007; Li *et al.*, 2008).

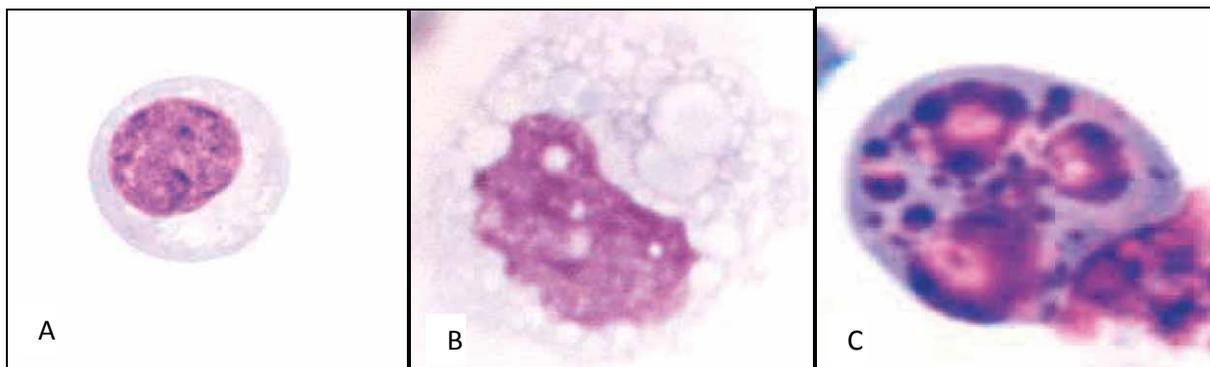


Figura 3. Diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis. Tomado y modificado de Fenech, 2007.

- A)** Célula mononucleada; Célula con membrana nuclear y citoplasmática íntegra.
- B)** Necrosis temprana; Presencia de numerosas vacuolas en el citoplasma y núcleo íntegro.
- C)** Apoptosis tardía; Fragmentación de ADN encapsulado en "cuerpos apoptóticos"

Leucemia.

El cáncer está constituido por un grupo de desequilibrios celulares que con frecuencia pueden desembocar en la muerte (Díaz, 2007). La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas. Se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica. El aumento de células hematopoyéticas inmaduras se explica por la proliferación desregulada de clones derivados de la transformación de células progenitoras. Las células leucémicas no se diferencian debido a que los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación se ven afectados, los cuales les confieren ventajas de crecimiento sobre las células que participan en la hematopoyesis normal (Jandl, 1991 y Cousar, 1999).

Las leucemias se dividen en dos grupos: crónicas y agudas (figura 4). Éstas a su vez se clasifican en mieloides y linfoides dependiendo del progenitor celular del que se derive. Las leucemias crónicas se caracterizan por su curso indolente, su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Estas células interfieren en la producción de linfocitos y granulocitos que presentan características morfológicas similares a células maduras pero no son funcionales. Este tipo de leucemias es más frecuente en personas mayores a 50 años (Kantarjian *et al.*, 1988).

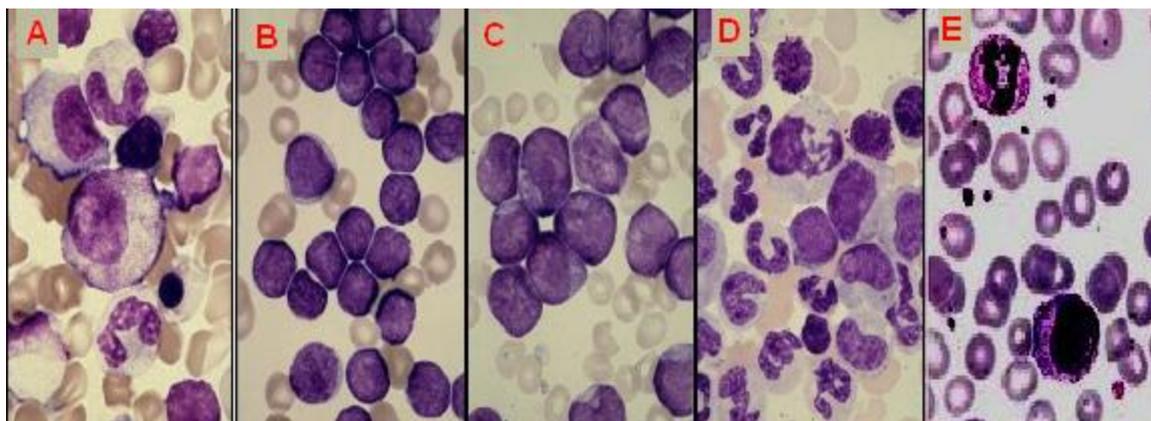


Figura 4. Tipos de leucemia (Tomado y modificado de [http://www-sdc.med.nagasaki-u-ac.jp/n50/disaster/leukemia-E.html](http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/n50/disaster/leukemia-E.html))

- A)** Medula ósea normal (Control); granulocitos normales y eritroblastos.
- B)** Leucemia linfóide aguda; Marcada proliferación de blastos pequeños.
- C)** Leucemia mieloide aguda; Marcada proliferación de mieloblastos grandes.
- D)** Leucemia mieloide crónica; Marcada proliferación de granulocitos en varios estadios.
- E)** Leucemia linfóide crónica; Acumulación de linfocitos B.

Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la acumulación de células “blásticas” (Gutiérrez, 2006), puede ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética o bien de sus descendientes. También puede influir la activación de protooncogénos que muchas veces se acompañan de inactivación de uno o varios genes supresores (Labardini, 2006). Este tipo de leucemia también se clasifica en linfóide y mieloide siendo ésta última la que más incidencia de muertes provoca en las personas. La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por un incremento en el número de células blásticas mieloides en la médula ósea, acompañado de un bloqueo en su maduración, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos. La presencia mayor al 30% de blastos en médula ósea es un criterio necesario para el diagnóstico definitivo de esta enfermedad. Frecuentemente los pacientes con LMA presentan insuficiencias hematopoyéticas (granulocitopenia, trombocitopenia o anemia, con o sin leucocitosis) (Löwenberg *et al.*, 1999).

Los tratamientos que se utilizan actualmente para combatir a la leucemia son: quimioterapia, trasplante de médula ósea, inmunoterapia y bloqueadores de blancos moleculares. La mayoría de los agentes anticancerígenos ejercen su actividad

cuando la célula se está dividiendo, activando el mecanismo de apoptosis de las células cancerígenas. Sin embargo estas terapias tienen efectos secundarios que constituyen un alto riesgo de daño a las células normales, deteriorando la calidad de vida del paciente (Tallman *et al.*, 2005). Debido a la falta de selectividad de los agentes anticancerígenos y a la resistencia que desarrollan algunas células cancerígenas a dichos productos, la tasa de sobrevivencia a largo plazo en la LMA es de aproximadamente el 20% (Setzer y Setzer, 2003; Estey 2009), por lo que es necesario encontrar nuevos agentes antitumorales, que se traduzcan en nuevas estrategias terapéuticas para solucionar problemas hemato-oncológicos.

Genero *Sechium*

El descubrimiento de agentes medicinales a partir de plantas ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer. De hecho la mayoría de las nuevas aplicaciones clínicas de metabolitos secundarios y sus derivados han sido dirigidas hacia el tratamiento y prevención de dicha enfermedad. Actualmente el 60% de los medicamentos anticancerígenos provienen de fuentes naturales (Cragg *et al.*, 2005; Balunas *et al.*, 2005). Llamam la atención estudios recientes en los que el uso de extractos naturales como el proveniente de *Prunus armeniaca* inhiben el desarrollo de tumores de esófago en modelos de ratón (Yamai *et al.*, 2009); los extractos ricos en lectinas provenientes de *Viscum album* L. pini and habitéis tienen actividad antileucémica (Seifert *et al.*, 2008), incluso se reporta que el extracto crudo de algunas plantas tienen mayor actividad antitumoral que la molécula purificada (Anesini *et al.*, 2001) así, el extracto crudo de *Rosmarinus officinalis* L. en combinación con el antileucémico vitamina D muestran efecto sinérgico en la eliminación de células leucémicas WEHI-3 de ratón *in vitro* e *in vivo*, con reducidos efectos secundarios (Sharabani *et al.*, 2006; Shabtay *et al.*, 2008). Por lo anterior se ha iniciado la exploración del uso combinado de antitumorales con extractos crudos de plantas (Sharabani *et al.*, 2006; Shabtay *et al.*, 2008; Yamai *et al.*, 2009).

México es un país de gran riqueza biológica, además de ser centro de origen y domesticación de entre 66 a 102 especies cultivadas, multiplicadas por las diferentes variedades y con gran cantidad de razas, muchas de ellas semidomesticadas y con abundancia de parientes silvestres (Hernández, 1985; Rzedowski, 1991). Una de las

familias botánicas importantes en las culturas Mesoamericanas, por la diversidad de especies integradas a la dieta y a la medicina, es la familia Cucurbitaceae. Dentro de dicha familia encontramos al género *Sechium* constituido por 8 especies silvestres y dos domesticadas en el que se ubica a *Sechium edule* (Jacq) Sw., “chayote”, una especie vegetal neotropical endémica de México (Lira *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2007). Es una planta herbácea y trepadora que presenta amplia variación morfológica, la cual abarca frutos carnosos de diversas formas y dimensiones (péndulo, globosos, ovoides, piriformes, oblongos, etc.) con un número variable de depresiones longitudinales, colores de epidermis (blanco, verde claro u oscuro y brillante, amarillento, etc.), grados de espinosidad (inermes a densamente espinosos), sabor (amargo, ligeramente amargo y dulce) y polimorfismo en hojas y flores. Las características anteriores han permitido establecer diferentes grupos varietales (Lira *et al.*, 1999; Cadena *et al.*, 2007), sobresaliendo que el sabor amargo sólo se conserva en las especies silvestres de *Sechium*, algunas de ellas endémicas de México, de los cuales no se tiene documentado su uso alimenticio o medicinal, aunque se ha reportado que es consumido por armadillos (Cadena, 2005) (Figura 5). Algunas especies endémicas de México es *Sechium chinantlense* (Lira & Chiang) la cual ha sido descrita solo en el estado de Oaxaca. Esta especie difiere de los chayotes domesticados y silvestres en la estructura de los estambres, el número cromosómico ($2n=30$) y en algunos rasgos palinológicos, pero al igual que *Sechium edule*, desarrolla una hendidura apical en los frutos. *Sechium compositum* (J.D. Smith) C. Jeffrey) únicamente se ha recolectado en Chiapas y zonas vecinas de Guatemala, tiene número cromosómico de $n=14$, estructura estaminal más delgada y rectas en comparación con *Sechium edule* y los frutos no tienen hendidura apical (Lira *et al.*, 1999) (Figura 5). Recientemente el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM) ha desarrollado hibridaciones entre especies del género *Sechium*. El resultado de este trabajo es el híbrido H-386-07-GISeM, el cual está en proceso de estudio.

Por otro lado, de las plantas utilizadas en la etnobotánica se calcula que el 58% de éstas no se han estudiado con respecto a su composición química y actividad biológica (Vega *et al.*, 2006). Dentro de este último grupo se encuentran las especies silvestres del género *Sechium*.



Figura 5. Morfología de los frutos de especies del género *Sechium*

- A)** *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*; fruto ovoides con abundante espinas.
- B)** *Sechium chinantlense*; fruto pequeño y redondo.
- C)** *Sechium compositum*; fruto ovoides y carece de espinas.

Durante muchos años, se asumió que *Sechium* era un género monotípico, cuya única especie era *Sechium edule*. Actualmente se acepta que dentro del género hay diez especies de las cuales ocho son silvestres (*S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pitteri*, *S. venosum* y *S. vilosum*), y dos cultivadas (*Sechium tacaco* y *Sechium edule*) (Lira *et al.*, 1996). La especie más estudiada es *Sechium edule* debido a que se usa para consumo humano. Esta especie contiene aminoácidos como: lisina, cisteína, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, histidina, arginina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, tirosina, alanina y metionina en frutos y semillas, por lo que es un componente notable en la dieta hospitalaria (Flick *et al.*, 1978; Flores *et al.*, 1989).

En la medicina tradicional se tiene reportado que el té de hojas y frutos de *Sechium edule* tiene efectos diuréticos, propiedades anti-inflamatorias, se emplea para tratar calcificaciones renales y se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión. (Lira, 1996; Abdelnour *et al.*, 2002). También se ha reportado el uso de chayote en la inflamación intestinal y cutánea así como en la cauterización de úlceras (Flores, 1989; Ribeiro *et al.*, 1988; Lozoya, 1980; Bueno *et al.*, 1970).

En este contexto, como un intento de explicar algunos efectos medicinales de *S. edule* se han realizado estudios farmacológicos a partir de extractos de chayote. En 2001 Yen y colaboradores mostraron que extractos acuosos de *Sechium edule* tienen potencial antimutagénico indirecto sobre un sistema bacteriano (cepas de *Salmonella thiphimurium*). Ordoñez *et al.*, en el 2006 determinó que los extractos etanólicos y acuosos de hojas y semillas de *Sechium edule* tuvieron una fuerte actividad de inhibición en la decoloración del B-caroteno y determinaron que poseen la capacidad de donación de hidrógeno en presencia de radicales DDPH y un fuerte poder reductor por el método de ferrocianuro de potasio, que es un indicador de actividad antioxidante.

Adicionalmente reportaron una relación proporcional de los mayores contenidos de compuestos polifenólicos y flavonoides totales con la actividad antioxidante. Los antioxidantes han sido considerados como una terapia para la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer ya que previenen los altos niveles de oxidantes que ocasionan daño celular y que promueven actividad cancerígena (Seifried *et al.*, 2007). Metabolitos secundarios tales como: alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos y ésteres de ácidos grasos tienen actividad citotóxica sobre varias líneas cancerígenas (Seong *et al.*, 2007; Setzer y Setzer, 2003), y se ha mostrado que estos fitoquímicos están contenidos en el fruto de *Sechium edule* (Salama *et al.*, 1986; Monroy *et al.*, 2009).

Otro estudio estableció que los frutos de *Sechium edule* contienen Sechiumina, lo cual es una proteína que inhibe la actividad ribosomal en HeLa (línea celular de cáncer cérvico-uterino) (Tsann *et al.*, 1998). Por otro lado *Sechium edule* se ha caracterizado en ocho variedades botánicas y en un análisis químico de extractos etanólicos de frutos de chayote se ha determinado la presencia de terpenos en todas las variedades (Cadena *et al.*, 2007). Por otra parte se mostró que extractos etanólicos obtenidos de las variedades de chayote tienen efecto antiproliferativo para la línea tumoral de ratón L929 (fibrosarcoma de pulmón) y la línea leucémica P388 (leucemia mielóide). El extracto de la variedad *nigrum spinosum* fue el que presentó mayor potencial antiproliferativo con una IC₅₀ entre 0.4 y 1 mg/ml en P388 y entre 1 y 2 mg/ml para L929 (Salas y Torres, 2007). La actividad antiproliferativa es de suma importancia ya que es una propiedad básica de agentes antineoplásicos (Setzer y

Setzer, 2003). Además, considerando que las propiedades fitoquímicas se comparten entre especies relacionadas (Vicanco *et al.*, 2005), es posible que otras especies de *Sechium* compartan la propiedad de tener actividad antiproliferativa; de ser así, se estarían dando las bases para encontrar una posible estrategia terapéutica antileucémica, información que puede ayudar a mejorar la calidad de vida del paciente, reducir costos de tratamiento y además colocar al género *Sechium*, un producto agrícola nacional, como valiosa fuente alternativa de investigación biomédica y ayudar así a revalorar a una planta endémica del país. Por lo anterior es indispensable hacer estudios sobre otras especies del género *Sechium* ya que no existe información sobre su actividad antiproliferativa en líneas tumorales.

Planteamiento del problema

Se ha observado que el extracto crudo de frutos de ocho variedades de *Sechium edule* tienen diferente potencial antiproliferativo, siendo la variedad *nigrum spinosum* una de las que presenta mayor efecto en la inhibición de la proliferación sobre las líneas celulares L929 y P388, pero se desconoce si los extractos de frutos de especies silvestres del mismo género también pueden afectar la proliferación de líneas leucémicas mieloides.

Justificación

El cáncer es una enfermedad que se considera la primera causa de muerte a nivel mundial. En México ocurren 63,000 muertes ocasionadas por el cáncer de los cuales el 12.8 % es provocado por algún tipo de leucemia, siendo este tipo de cáncer el más frecuente en niños y la segunda causa de muerte en infantes mexicanos; las terapias existentes para tratar a la leucemia son tóxicos para el paciente deteriorando su calidad de vida, además de que las células cancerígenas generan resistencia a los agentes anticancerígenos, Por lo anterior es necesario desarrollar alternativas terapéuticas que les proporcionen una mejor calidad de vida a pacientes con cáncer. El género *Sechium* ha sido poco estudiado en cuanto a su potencial anti-tumoral a pesar de que se considera que contienen fitoquímicos con alto potencial anti-leucémico. Si se muestra que los extractos de especies silvestres de *Sechium* tienen actividad anti-leucémica no solo se ofrece una nueva línea de investigación con aplicación biomédica de las especies endémicas de México, sino que sería una razón más para conservar el ambiente natural del chayote silvestre.

HIPÓTESIS

El extracto crudo de frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* tiene efecto inhibitorio en línea leucémica mielóide P388 y debido a que metabolitos secundarios son conservados entre miembros del mismo género, se espera que los extractos de las especies silvestres de *Sechium* inhiban la proliferación celular de líneas leucémicas mieloides.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos crudos de las especies silvestres *S. chinantlense*, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM sobre la proliferación y viabilidad de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de extractos crudos de especies silvestres *S. chinantlense*, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM sobre la proliferación de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774.
- Determinar la concentración de cada extracto requerida para reducir en un 50% la densidad celular (IC_{50}) en las líneas leucémicas P388 y J774.
- Evaluar el efecto de las IC_{50} de los diferentes extractos de *Sechium* sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón.
- Evaluar la viabilidad de las líneas celulares P388, J774 y médula ósea normal de ratón expuesta con la IC_{50} de cada extracto establecida para P388 y J774.
- Determinar si la IC_{50} para cada extracto de *Sechium* inducen a la formación de cuerpos apoptóticos en las líneas leucémicas.

MÉTODO

Obtención y preparación de extractos

Las especies empleadas en este estudio fueron: *S. chinantlense* con espinas (CE) y sin espinas (SE), *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM. Se utilizaron frutos de madurez hortícola, colectados *in situ* en el banco de germoplasma del GISeM ubicado en Huatusco, Veracruz.

Todo el fruto (semillas, epidermis y espinas) se cortó en trozos pequeños y fueron secados a 50°C con circulación de aire para posteriormente ser macerados para estandarizar el tamaño de partícula. La extracción se realizó con la metodología propuesta por Che *et al.* (1985), y Afifi *et al.* (1999), modificada por Cadena (2005). La cual consistió en realizar una extracción solido-liquido con metanol hasta agotar la muestra, colectando el extracto arrastrado por el disolvente en un matraz, seguido de evaporación a presión reducida hasta concentrar el extracto. Finalmente los extractos etanólicos fueron pesados y disueltos en solución fisiológica y posteriormente se esterilizaron con luz UV (Apéndice I).

Líneas celulares

La línea celular macrofágica P388 es ampliamente usada para el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Es proveniente de ratón DBA/2, presenta características típicas de macrófagos, como vesículas lisosomales, capacidad de adhesión, fagocitosis y formación de rosetas, vía la expresión de receptores Fc (Koren *et al.*, 1975), adicionalmente tienen la capacidad de formar tumores malignos y secretan IL-1 al medio (Hirose *et al.*, 1985).

La línea celular macrofágica J774 también se utiliza en el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Proviene de un reticulosarcoma generado en una hembra de ratón BALB/c en 1968. Tiene capacidad de formar tumores metastásicos en ratones, presenta receptores Fc, libera al medio IL-1 y lisozima (Ralph *et al.*, 1976), además se activan con anticuerpos dependientes de fagocitosis y su crecimiento es inhibido en presencia de LPS y sulfato de dextrán (Ralph *et al.*, 1977).

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares fueron obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection), se cultivaron con IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL NY, USA), manteniéndose a 37°C, al 5% de CO₂ y humedad saturante, con resiembra cada 48 h (Apéndice I).

Para determinar el efecto de los extractos sobre la proliferación celular se usó una densidad celular de 30,000 cel/ml para P388 y 13,000 cel/ml para J774. Las células se mantuvieron en cultivo durante 72 h en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA) en las condiciones ya mencionadas. Se usaron diferentes concentraciones (para el extracto H-387-07-GISeM y *S. chinantlense* SE 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 µg/ml y para el extracto de *S. chinantlense* CE, y *S. compositum* 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 µg/ml, empleando como controles la adición de PBS como vehículo y 5 µM de Ara-C como control positivo de inhibición de proliferación.

Adicionalmente mediante la ecuación de regresión lineal se determinó la concentración necesaria de cada uno de los extractos para disminuir aproximadamente un 50% la densidad celular (IC₅₀) en cada línea leucémica con respecto al vehículo.

Cultivo de CMN de médula ósea

Se usaron ratones hembras de 2 a 3 meses de edad clínicamente sanos de la cepa CD1 que fueron sacrificados por dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA). Posteriormente se separaron las CMN mediante un gradiente de densidad (ficol densidad=1.077 g/ml) (Sigma, St Louis, M). Por último se cultivaron las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e Interleucina 3 recombinante de ratón, a una densidad de 100,000 cel/ml en placas de 96 pozos (Corning NY, USA). Las células fueron estimuladas con la IC₅₀ de los extractos para cada línea celular: PBS como vehículo; H-387-07-GISeM (1.39 µg/ml, 0.61 µg/ml); *S. chinantlense* CE (2.32 µg/ml,

2.17 µg/ml); *S. chinantlense* SE (0.98 µg/ml, 0.26 µg/ml); *S. compositum* (2.75 µg/ml, 1.96 µg/ml) para P388 y J774 respectivamente y Ara-C como control (5 µM). Los cultivos fueron mantenidos durante 5 días en condiciones de cultivo.

Evaluación de la proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada mediante la técnica de cristal violeta modificada por Kueng, 1989 y originalmente propuesta por Gillies *et al.*, 1986. Brevemente, transcurridas las 72 h de incubación, las células fueron fijadas con 50 µL/pozo de glutaraldehído al 1.1% durante 1 h (Apéndice I). Posteriormente se eliminó el fijador y se adicionó 50 µL de la solución cristal violeta (Apéndice I) para teñir el núcleo de las células (Wakelin *et al.*, 1981) lo cual es un parámetro indirecto para determinar el número celular (Gillies *et al.*, 1986). La placa se mantuvo en agitación en un agitador de placas (Red Rotor, Instrumental electrónicas, USA) durante 5 min, al término de este periodo el colorante no asimilado por las células fue eliminado por lavados con agua destilada. Finalmente el colorante unido a las células se solubilizó con 50 µL de ácido acético al 10% (Apéndice I) y se dejó agitar la placa durante 20 min. Posteriormente se evaluó la placa a una densidad óptica de 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria) y se graficaron los valores de absorbancia en términos de porcentaje de proliferación de los diferentes estímulos con respecto al control.

Evaluación de viabilidad

Las células fueron mantenidas en cultivo durante 72 h en placas de 96 pozos de ultrabaja adherencia fondo plano (Corning NY, USA) en las condiciones ya mencionadas. Para evaluar la viabilidad celular se utilizó una prueba de exclusión al azul tripano, esta técnica se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células, ya que éste colorante es capaz de penetrar al interior de las células cuya membrana celular está dañada considerando a estas células no viables. Las células que no se tiñen de color azul se consideran vivas. Brevemente, se tomó 20 µL de IMDM con células adicionándoles 20 µL de colorante, en seguida se contaron las células vivas y muertas en el hemocitómetro bajo el

microscopio obteniendo el porcentaje de células vivas (Rodel 1996; Tanaka *et al.*, 1993).

Evaluación de Cuerpos apoptóticos

La aparición de cuerpos apoptóticos estrategias vigentes para detectar en forma sencilla y barata la inducción de muerte por apoptosis (Elmore, 2007; Fenech, 2007; Ling *et al.*, 1993), Por lo anterior, se realizaron ensayos con células P388 y J774 con ó sin la IC₅₀ de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* para cada línea celular. Las células fueron teñidas con colorante Giemsa y examinadas bajo el microscopio (Olympus BH-2), equipado con un lente de objetivo 100x. Cambios morfológicos como disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, la pérdida de la regularidad de la membrana celular fueron parámetros citomorfológicos evaluados en la formación de cuerpos apoptóticos. Se contaron 200 células de cada experimento para obtener el porcentaje de células normales y apoptóticas.

Manejo de datos.

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de manera independiente por cuadruplicado. Los datos son presentados como media \pm la desviación estándar. Para determinar la diferencia significativa se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey y Dunnett ($p < 0.05$) para obtener la diferencia significativa empleando el programa SPSS versión 11.0.

RESULTADOS

EFFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE ESPECIES SILVESTRES DE *Sechium* Y H-387-07-GISeM SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS LEUCÉMICAS MIELOIDES DE RATÓN P388 Y J774.

Previamente se había mostrado por el grupo GISeM que concentraciones de 0, 40, 230, 470, 1180 y 2370 $\mu\text{g/ml}$ de *Sechium edule* (Jacq) Sw. sobre la línea P388 se obtenía una curva de proliferación dosis-respuesta. Para evaluar el efecto antiproliferativo de H-387-07-GISeM sobre P388 se decidió emplear las mismas concentraciones (0, 40, 230, 470, 1180 y 2370 $\mu\text{g/ml}$), usando como control de inhibición de la proliferación celular 5 μM de Ara-C. Mediante la técnica de cristal violeta y después de 72 h de cultivo se encontró que no existe proliferación celular en P388 independientemente de la dosis empleada (Figura 6). Por lo anterior se decidió reducir las concentraciones del extracto empleando 0, 1.2, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 230 $\mu\text{g/ml}$, estas dos últimas sirven como puntos de referencia con el ensayo anterior. Los datos revelaron que la proliferación también es afectada en más del 50% a partir de las concentraciones menores (Figura 7), por lo que usando el mismo razonamiento se emplearon concentraciones de 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 ó 5 $\mu\text{g/ml}$, observando bajo el microscopio una reducción de la densidad celular en forma dosis-dependiente (Figura 8) y por cristal violeta se obtuvo claramente la curva de inhibición de la proliferación celular, donde se obtiene que existe una disminución significativa a partir de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9).

En relación a la línea celular leucémica de ratón J774, también fue necesario el ejercicio de dilución seriada, para establecer que con 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 ó 5 $\mu\text{g/ml}$ del extracto de H-387-07-GISeM se observó bajo el microscopio una reducción de la densidad celular en forma dosis-dependiente (Figura 10), lo cual se correlaciona con la reducción de la proliferación celular revelada con cristal violeta, donde se observa una disminución significativa a partir de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9).

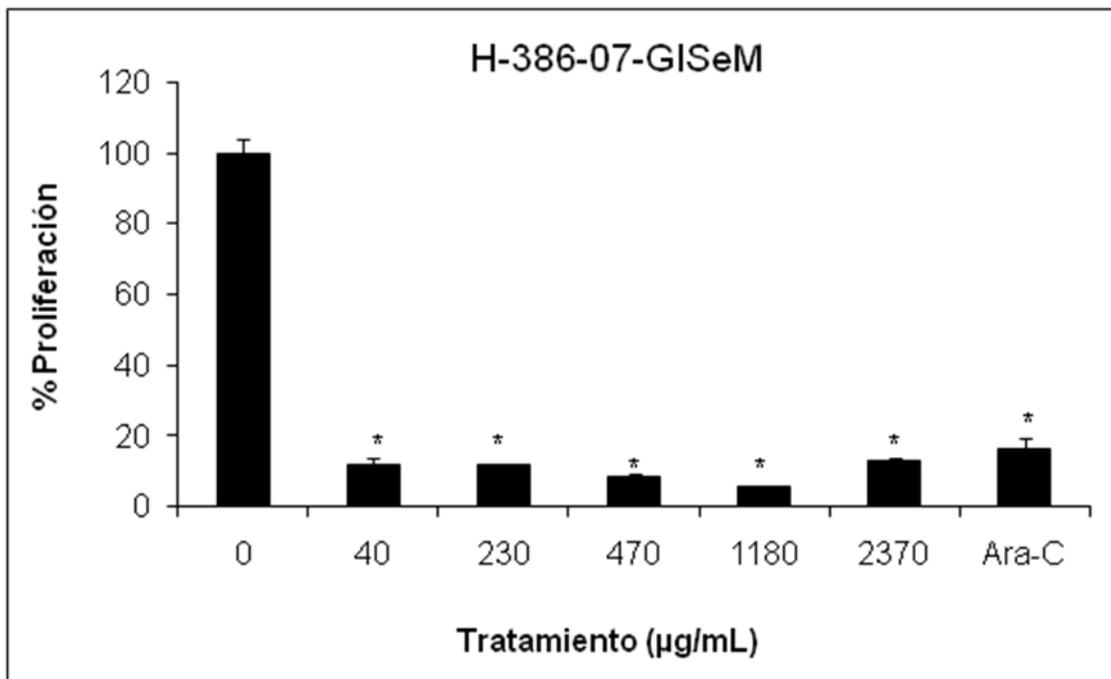


Figura 6.- Porcentaje de proliferación evaluada por cristal violeta después de 72 h de cultivo de la línea leucémica P388 expuesta a 0, 40, 230, 470, 1180 ó 2370 µg/ml de extracto de H-387-GISem. Se incluye Ara-C (5 µM) como control de inhibición de la proliferación. *Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al vehículo (0 µg/ml).

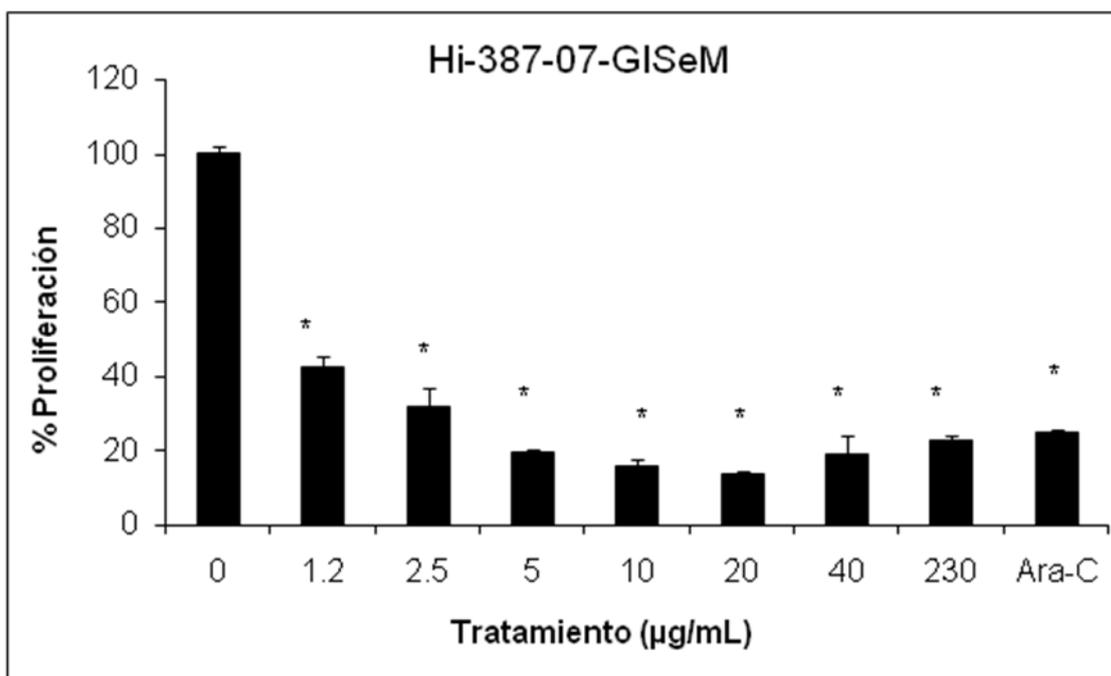


Figura 7.- Porcentaje de proliferación evaluada por cristal violeta después de 72 h de cultivo de la línea leucémica P388 expuesta a 0, 1.2, 2.5, 5, 10, 20, 40, 230 µg/ml de extracto de H-387-GISem. Se incluye Ara-C (5 µM) como control de inhibición de la proliferación. *Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al vehículo (0 µg/ml).

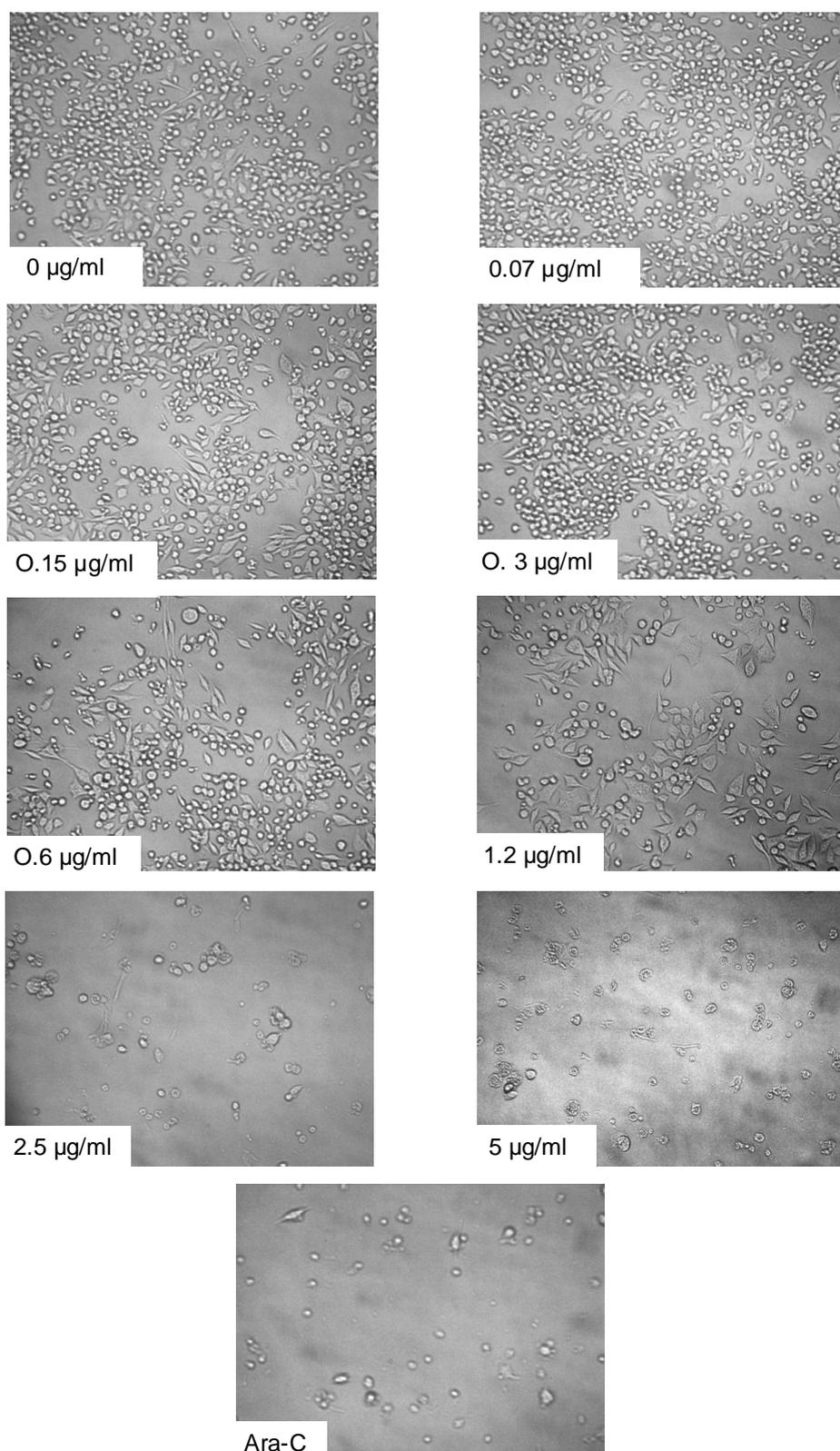


Figura 8. Reducción de la densidad celular observada bajo el microscopio (10X) después de 72 h de cultivo de la línea celular P388 con o sin diferentes concentraciones de extracto de H-387-07-GISem. Se incluye Ara-C (5 µM) como control de inhibición de la proliferación.

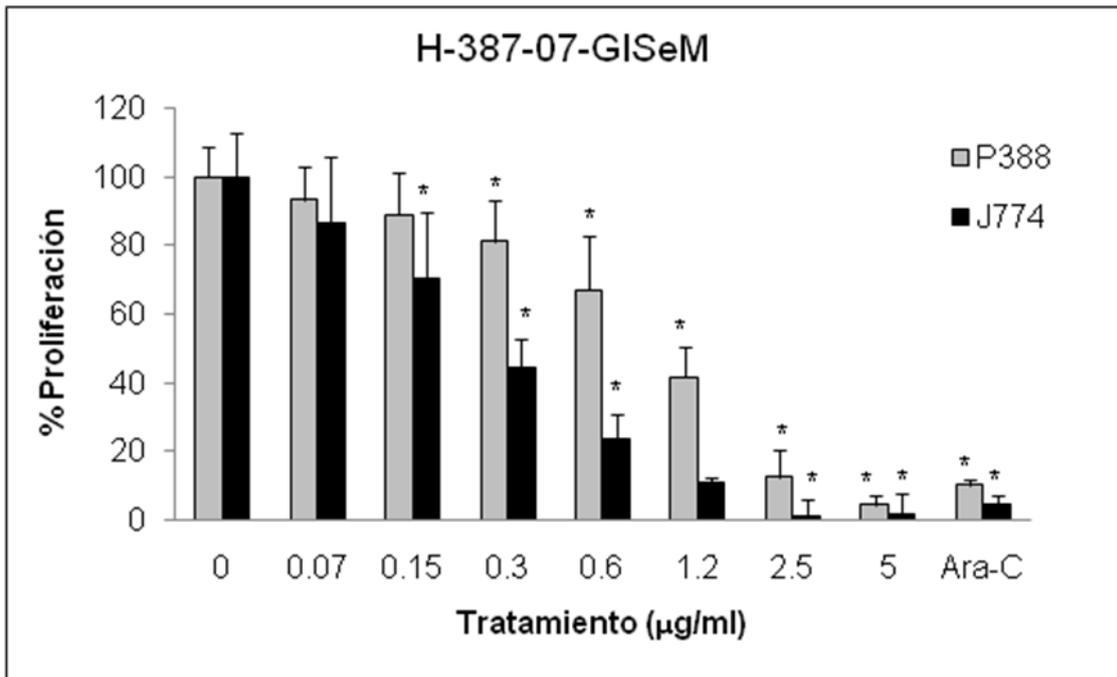


Figura 9.- Porcentaje de proliferación evaluada por cristal violeta después de 72 h de cultivo de la línea leucémica P388 y J774 expuesta a 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 µg/ml de extracto de H-387-GISeM. Se incluye Ara-C (5 uM) como control de inhibición de la proliferación. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al vehículo.

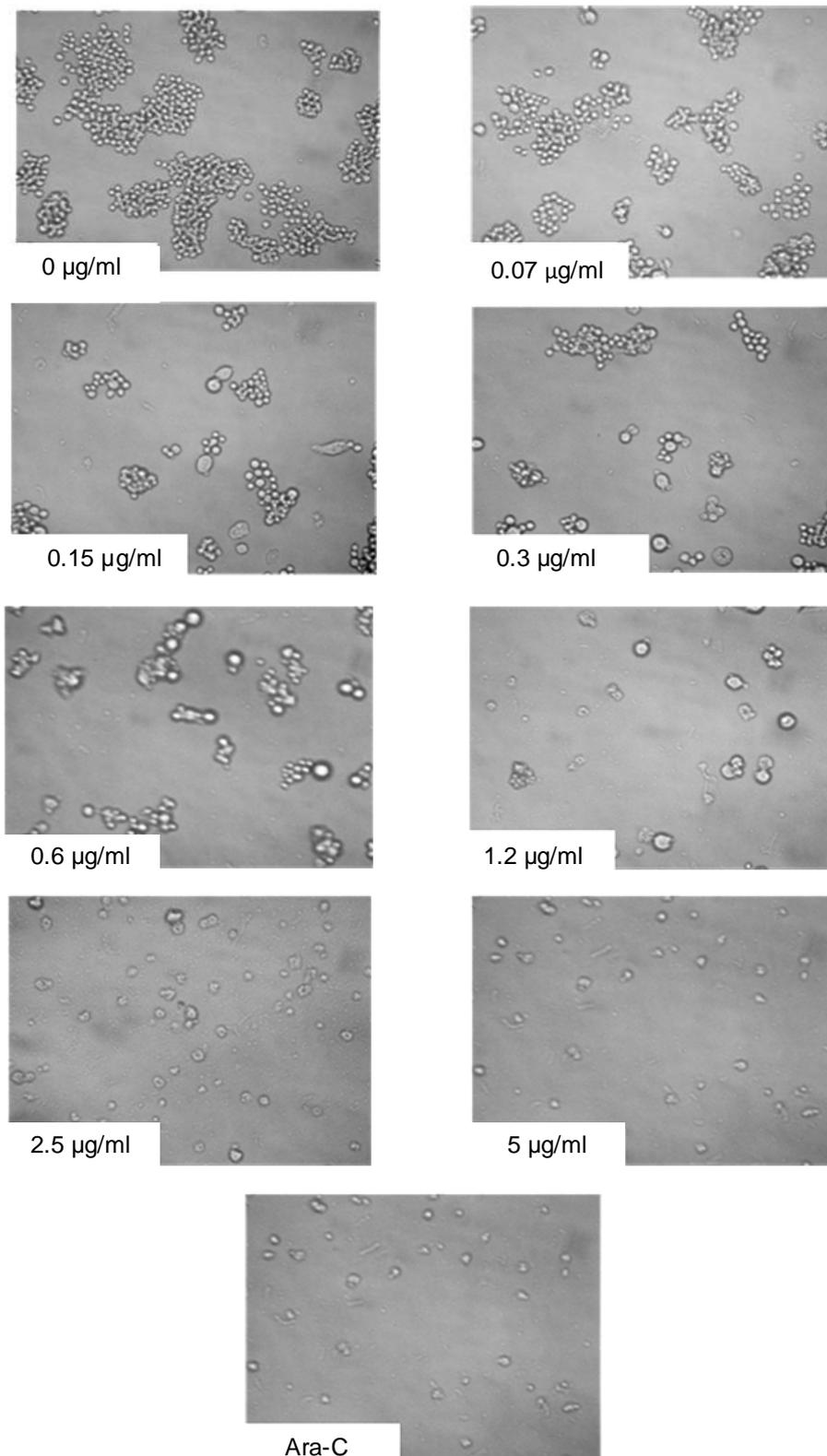


Figura 10. Reducción de la densidad celular observada bajo el microscopio (10X) después de 72 h de cultivo de la línea celular J774 con o sin diferentes concentraciones de extracto de H-387-07-GISem. Se incluye Ara-C (5 µM) como control de inhibición de la proliferación.

Debido a que tampoco se conocía el potencial para inhibir la proliferación celular del extracto de *S. chinantlense* con espinas (CE), *S. chinantlense* sin espinas (SE) y *S. compositum*, fue necesario realizar los mismos ensayos de dilución en ambas líneas leucémicas, por lo que se llegó a establecer que con 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 ó 5 µg/ml de extracto de *Sechium chinantlense* SE y 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 ó 20 µg/ml de extracto de *Sechium chinantlense* CE ó *Sechium compositum*, se obtiene una reducción de la proliferación en forma dosis-dependiente. Así para el extracto de *S. chinantlense* CE se observa que hay una disminución significativa ($p < 0.05$) de la proliferación a partir de 0.3 µg/ml en las líneas leucémicas P388 y J774. La proliferación disminuye en forma dosis-dependiente hasta una concentración máxima de 20 µg/ml en donde la proliferación desciende en más del 90% (Figura 11).

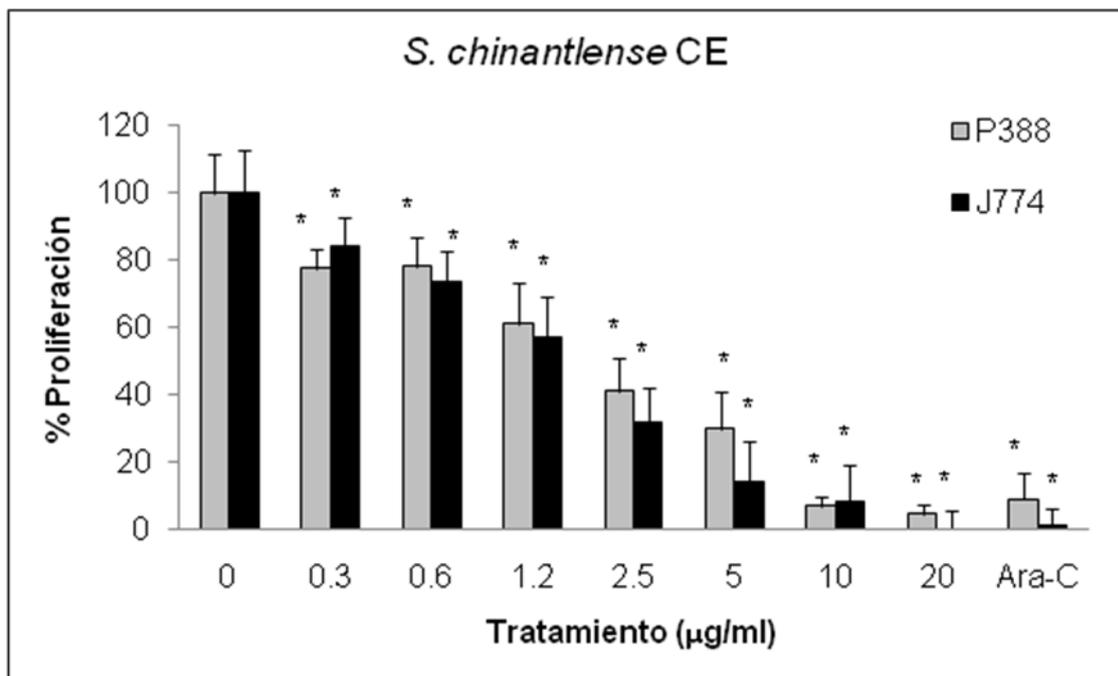


Figura 11.- Reducción de la proliferación celular en forma dosis-dependiente inducida por el extracto de *S chinantlense* CE sobre las líneas leucémicas P388 y J774. Evaluación por cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 µg/ml y Ara-C (5 µM). *Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al vehículo.

Para el extracto de *S. chinantlense* SE los datos obtenidos muestran que en P388 hay una disminución significativa ($p < 0.05$) de la proliferación a partir de 0.3 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para J774 es de 0.15 $\mu\text{g/ml}$. Mientras que para el caso de *S. compositum* hay diferencia significativa a partir de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ en células P388 y 0.3 $\mu\text{g/ml}$ en J774. La proliferación disminuye en forma dosis-dependiente hasta una concentración máxima de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ en donde la proliferación desciende en más del 80%, actividad similar a Ara-C para *S. chinantlense* SE (Figura 12) y de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de *S. compositum* para J774 y P388 respectivamente (Figura 13).

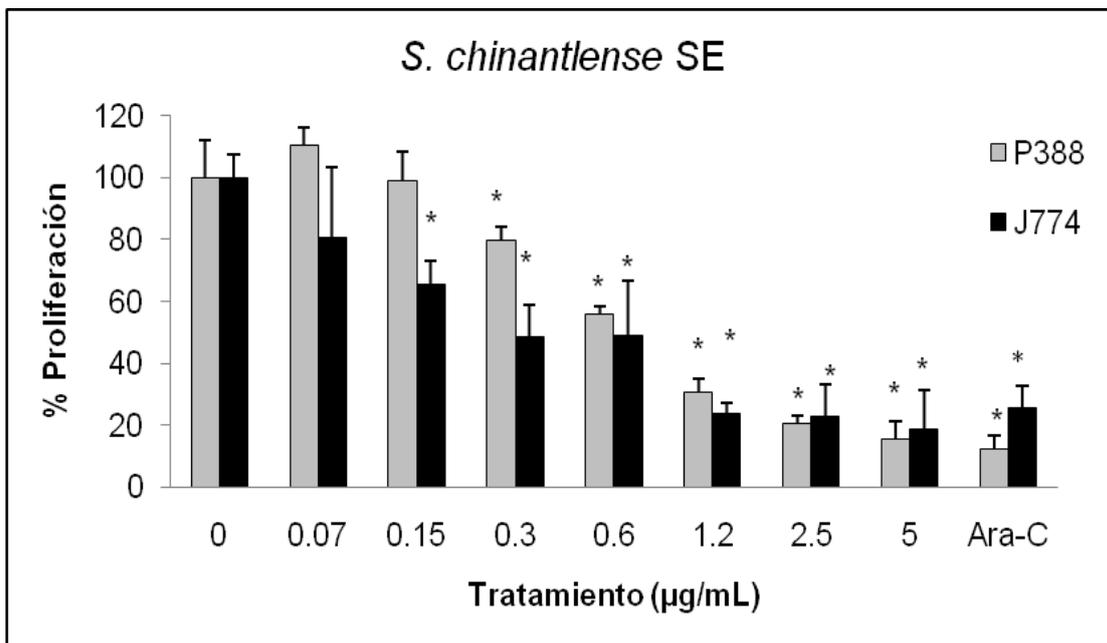


Figura 12.- Reducción de la proliferación celular en forma dosis-dependiente inducida por el extracto de *S. chinantlense* SE sobre las líneas leucémicas P388 y J774. Evaluación con cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ y Ara-C (5 μM). *Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al vehículo.

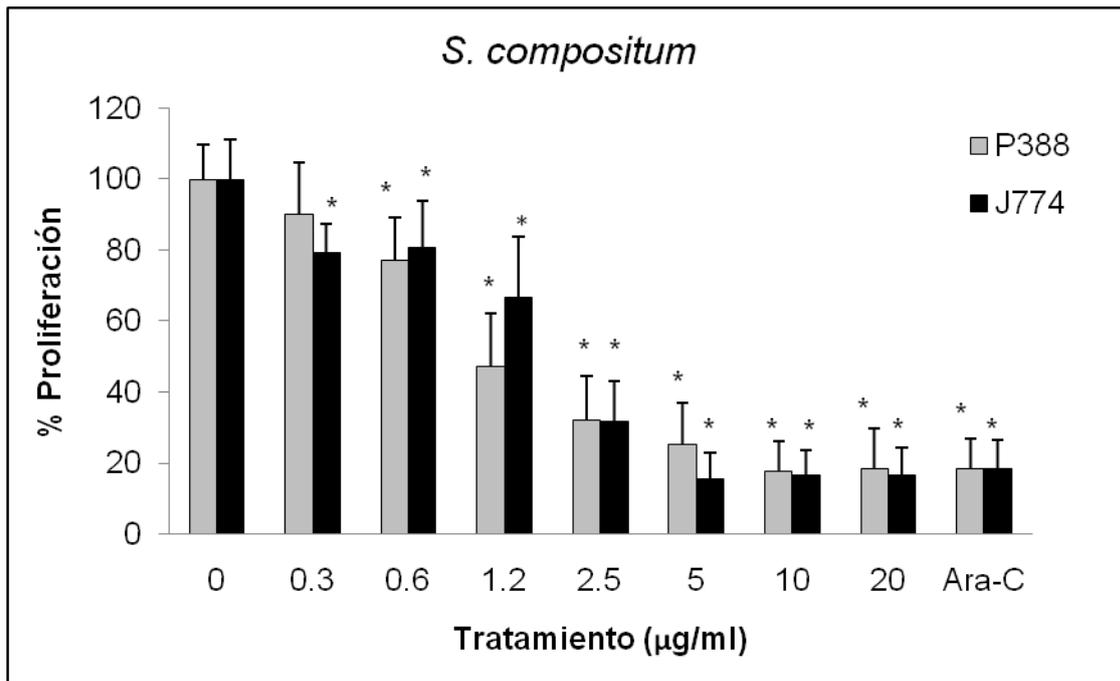


Figura 13.- Reducción de la proliferación celular en forma dosis-dependiente inducida por el extracto de *S. compositum* sobre las líneas leucémicas P388 y J774. Evaluada por cristal violeta después de 72 h en condiciones de cultivo. Control con vehículo (0), 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 µg/ml y Ara-C (5 µM). *Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al vehículo.

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS DE *Sechium*, REQUERIDAS PARA DISMINUIR EN UN 50% LA DENSIDAD CELULAR (IC₅₀) EN LAS LÍNEAS LEUCÉMICAS P388 Y J774.

En las gráficas anteriores se muestran las curvas de inhibición de la proliferación celular de tipo dosis-dependiente sobre las líneas leucémicas tratadas con los diferentes extractos de *Sechium*. En base a las gráficas se obtuvo una ecuación de regresión lineal que permitió obtener el valor de la recta y con ellas determinar los valores de concentración que indican un decremento aproximado del 50% la densidad celular (IC₅₀) (Tabla 1).

Tabla 1.- Valores de IC₅₀

	IC ₅₀ (µg/ml)	
	P388	J774
S. H-387-07-GISeM	1.39 ± 0.1	0.61 ± 0.02
S. chinantlense CE	2.32 ± 0.32	2.17 ± 0.01
S. chinantlense SE	0.98 ± 0.14	0.26 ± 0.02
S. compositum	2.75 ± 0.32	1.96 ± 0.12

IC₅₀ de extractos de *Sechium* sobre las líneas leucémicas P388 y J774 calculada a base de la curva dosis-respuesta con la ayuda de una ecuación de regresión lineal.

EFFECTO DE LAS IC₅₀ DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Sechium* SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL DE RATÓN.

Es importante determinar si la actividad de los extractos de *Sechium* se restringe solamente a células leucémicas o también afecta el potencial proliferativo de células normales. Para evaluar dicha actividad se procedió a evaluar el efecto de los extractos sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón en un cultivo *in vitro*. Las células fueron tratadas con o sin la IC₅₀ de los extractos para cada línea celular: H-387-07-GISeM (1.39 µg/ml, 0.61 µg/ml); *S. chinantlense* CE (2.32 µg/ml, 2.17 µg/ml); *S. chinantlense* SE (0.98 µg/ml, 0.26 µg/ml); *S. compositum* (2.75 µg/ml, 1.96 µg/ml) para P388 y J774 respectivamente y Ara-C como control (5 µM).

Los resultados indican que la IC₅₀ del extracto de H-387-07-GISeM disminuye en un 20% (IC₅₀ J774) y 40% (IC₅₀ P388) la proliferación de médula ósea, mientras que las otras dosis empleadas la reducen en aproximadamente en un 50%, excepto la IC₅₀ J774 (0.26 µg/ml) para *S. chinantlense* SE que solo inhibe aproximadamente un 20 % (Figura 14).

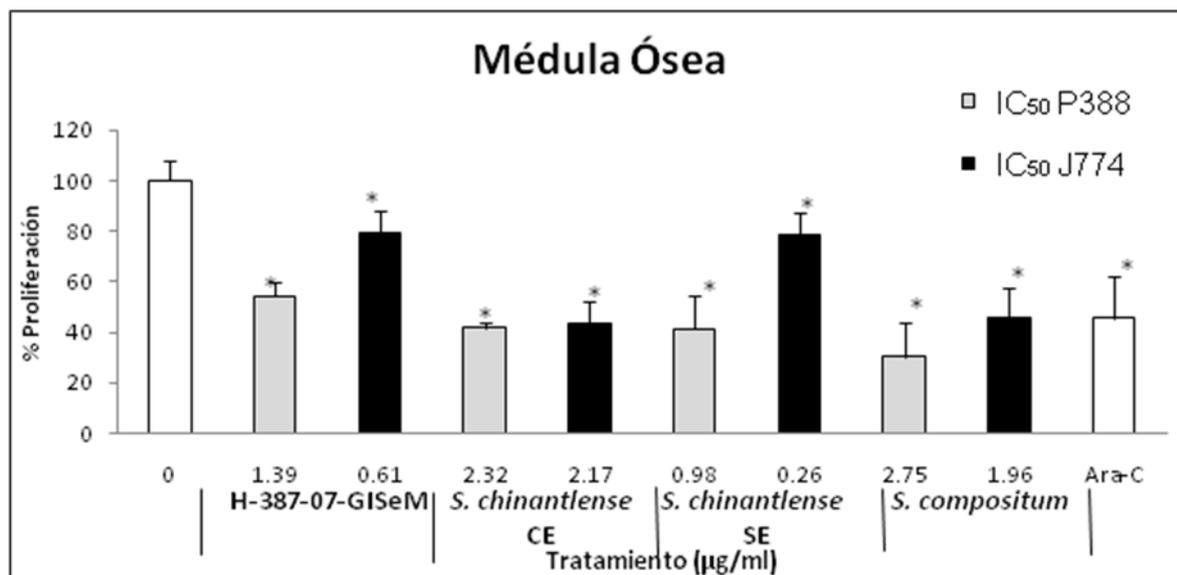


Figura 14.- Porcentaje de proliferación celular alcanzada por las células mononucleadas de médula ósea normal de ratón en presencia de las IC₅₀ de los extractos de *Sechium*. Evaluación con cristal violeta después de 72 h de cultivo. H-387-07-GISeM (1.39 µg/ml, 0.61 µg/ml); *S. chinantlense* CE (2.32 µg/ml, 2.17 µg/ml); *S. chinantlense* SE (0.98 µg/ml, 0.26 µg/ml); *S. compositum* (2.75 µg/ml, 1.96 µg/ml) correspondiente a la IC₅₀ para J774 e IC₅₀ para P388 respectivamente y Ara-C (5 µM). *Diferencia significativa (p<0.05) con respecto al vehículo (0 ug/ml).

VIABILIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES P388 Y J774 Y MÉDULA ÓSEA NORMAL DE RATÓN, TRATADAS CON LAS IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS DE *Sechium*.

Al encontrar que las células tratadas con diferentes dosis de los extractos de H-837-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE y *S. compositum* reducen su proliferación se procedió a evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad de las líneas celulares P388 y J774 y células de médula ósea. Para el caso de las líneas P388 y J774 se utilizaron las IC₅₀ correspondientes, así como una dosis menor y una mayor a la IC₅₀ para cada extracto, utilizando como control positivo de inhibición al Ara-C (5 µM). Después de 72 h en cultivo se evaluó el porcentaje de viabilidad por exclusión con azul tripano.

Los datos obtenidos muestran que la línea celular P388 tratada con los extractos de H-387-07-GISeM (0.69, 1.39, 2.7 µg/ml), *S. chinantlense* CE (1.16, 2.32, 4.6 µg/ml), *S. chinantlense* SE (0.49, 0.98, 1.97 µg/ml) y *S. compositum* (1.37, 2.75, 5.5 µg/ml) dosis menor, IC₅₀ y dosis mayor respectivamente, la viabilidad se disminuye significativamente (p≤0.05) usando la IC₅₀ o concentración mayor independientemente del extracto empleado (Tabla 2).

Para el caso de la línea celular J774 tratada con los extractos de H-387-07-GISeM (0.3, 0.61, 1.2 µg/ml), *S. chinantlense* CE (1.05, 2.17, 4.3 µg/ml), *S. chinantlense* SE (0.13, 0.26, 0.52 µg/ml) y *S. compositum* (0.98, 1.96, 2.8 µg/ml) dosis menor, IC₅₀ y dosis mayor respectivamente, la viabilidad se disminuye significativa (p≤0.05) solo con una dosis mayor a la IC₅₀ (Tabla 2). Las células P388 y J774 tratadas con Ara-C 5 µM tienen una viabilidad del 0% y del 42.4% respectivamente con respecto al vehículo (Tabla 2).

Tabla 2.- Viabilidad celular.

VIABILIDAD (%)						
	Vehículo	S. H-387-07-GISeM	S. chinantlense CE	S. chinantlense SE	S. compositum	Ara-C
P388	<IC ₅₀	86.1±11.2	85.5±13	83.2±17.0	72.5±4.4*	
	IC ₅₀	97.3±10	76.1±17.6*	75.6±14.9*	54.5±14.6*	0±0*
	>IC ₅₀		41.1±9*	48.2±9.1*	36.3±13.4*	
J774	<IC ₅₀	95.1±5.4	88.7±10.2	95.1±5.4	97±7.6	
	IC ₅₀	100±6.8	93±7.4	83.9±11.3	93±7.4	42.4±11.2*
	>IC ₅₀		60.5±14.4*	48.1±12.8*	84.6±7.3	51.4±13.8*

Viabilidad de células P388 y J774 tratadas con o sin la IC₅₀ junto con una dosis menor y una mayor de los extractos de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE y *S. compositum*. Evaluación por exclusión con azul tripano después de 72 h en condiciones de cultivo. *Diferencia significativa (p<0.05) con respecto al vehículo.

Por otra parte, se determinó la viabilidad de células de médula ósea tratada con extractos de *Sechium*. Para evaluar dicho efecto, se realizaron ensayos *in vitro* con células de médula ósea normal de ratón tratadas con o sin la IC₅₀ de los extractos para la línea celular P388 y J774: H-387-07-GISeM (1.39 µg/ml, 0.61 µg/ml); *S. chinantlense* CE (2.32 µg/ml, 2.17 µg/ml); *S. chinantlense* SE (0.98 µg/ml, 0.26 µg/ml); *S. compositum* (2.75 µg/ml, 1.96 µg/ml) para P388 y J774 respectivamente, y Ara-C 5 µM.

Se puede observar que los cultivo de médula ósea tratados con los extractos de *Sechium* no afecta la viabilidad de las células a excepción de la IC₅₀ del extracto de *S. compositum* para P388, en donde la viabilidad de la médula ósea disminuye significativamente ($p \leq 0.05$) sólo alcanza un 73%. Mientras que en los cultivos de médula ósea con Ara-C el porcentaje de viabilidad es del 0% (Tabla 3).

Tabla 3.- Viabilidad de células de médula ósea.

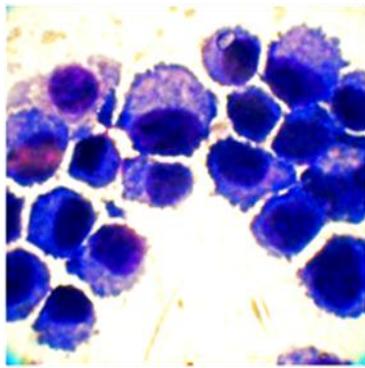
VIABILIDAD CELULAR (% viabilidad)						
	Vehículo	S. H-387-07-GISeM	S. <i>chinantlense</i> CE	S. <i>chinantlense</i> SE	S. <i>compositum</i>	Ara-C
IC₅₀ P388		100 ±19.4	98.3±21.3	100±16.1	73.3±27.6*	
IC₅₀ J774	97.4 ±5.1	100 ±9.1	99.2±11.8	100±19.2	86.81±17.8	0±0*

Tabla 3. Viabilidad de células de médula ósea tratadas con o sin la IC₅₀ de los extractos de *Sechium*: control con vehículo (0 µg/ml); H-387-07-GISeM (1.39 µg/ml, 0.61 µg/ml); *S. chinantlense* CE (2.32 µg/ml, 2.17 µg/ml); *S. chinantlense* SE (0.98 µg/ml, 0.26 µg/ml); *S. compositum* (2.75 µg/ml, 1.96 µg/ml) para P388 y J774 respectivamente y Ara-C 5 µM. Evaluada por exclusión con azul tripano después de 72 h en condiciones de cultivo. *Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al vehículo.

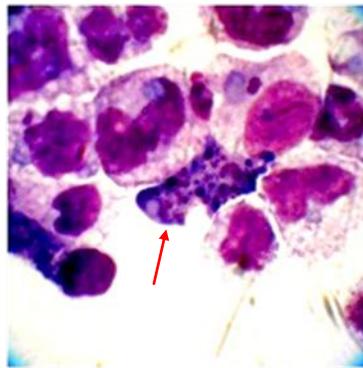
EFFECTO DE LAS IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS DE *Sechium* EN INDUCCIÓN A LA FORMACIÓN DE CUERPOS APOPTOTICOS EN LAS LÍNEAS LEUCÉMICAS

Una vez que se ha determinado que la actividad antiproliferativa de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* en las líneas leucémicas P388 y J774, en parte se relaciona a una reducción de la viabilidad celular, se procedió a explorar la posibilidad de una inducción de muerte celular genéticamente programada o apoptosis. Para ello se realizaron ensayos con células P388 y J774 con o sin la IC₅₀ de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* para cada línea celular. Las células fueron teñidas con colorante Giemsa y examinadas bajo el microscopio (Olympus BH-2), equipado con un lente de objetivo 100x

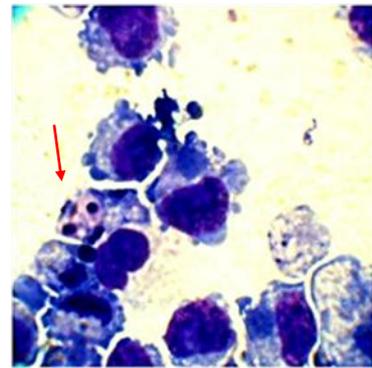
Bajo el microscopio se observó, en ambas líneas celulares, un aumento en células con cambios morfológicos tanto en la condensación y fragmentación de la cromatina y la presencia de cuerpos apoptóticos, independientemente del extracto empleado. En la figura 15 y 16 se observa un ensayo con células P388 y J774 respectivamente, estimuladas durante 48 h con extracto de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum*.



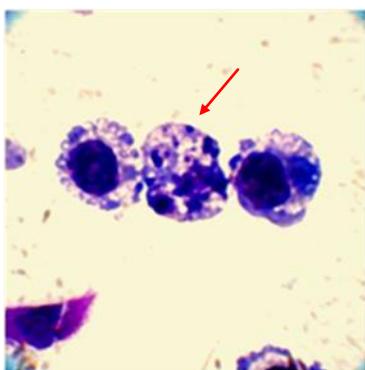
Vehículo



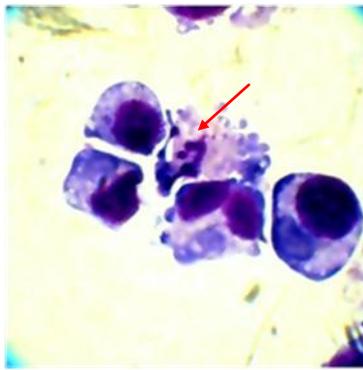
S. H-387-07-GISeM



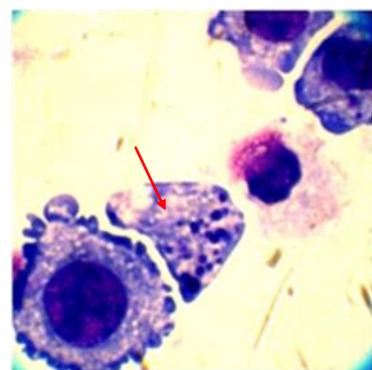
S. chinantlense CE



S. chinantlense SE



S. compositum



ARA-C

Figura 15.- Fotografías que muestran la presencia de cuerpos apoptóticos en células de la línea P388 después de 48 h al tratamiento con o sin la IC_{50} de extracto de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y Ara-C 5 μ M. Fotos tomadas en un microscopio (Olympus BH-2) equipado con un lente de objetivo 100x.

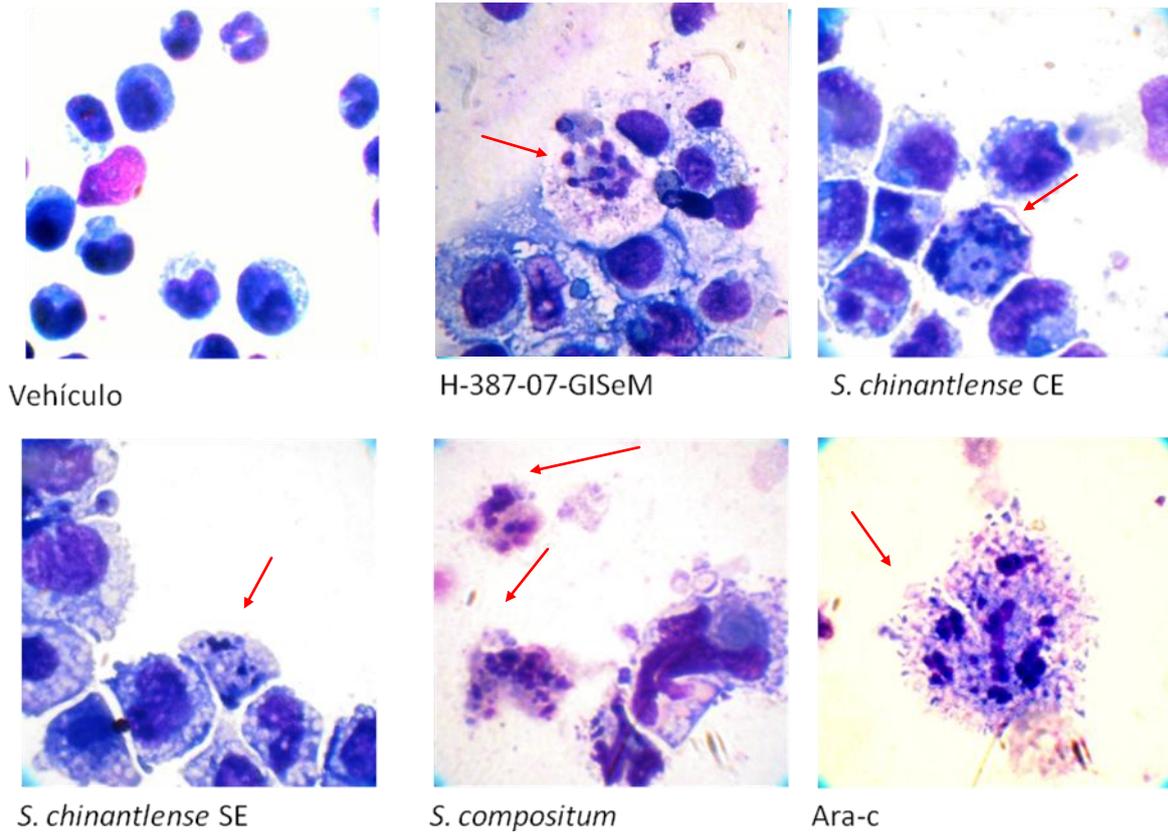


Figura 16.- Fotografías que muestran la presencia de cuerpos apoptóticos en células de la línea J774 después de 48 h al tratamiento con o sin la IC_{50} de extracto de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y Ara-C 5 μ M. Fotos tomadas en un microscopio (Olympus BH-2) equipado con un lente de objetivo 100x.

Por otra parte, los cultivos con vehículo, el porcentaje de cuerpos apoptóticos es de 0.5% y 0% en la línea celular P388 y J774 respectivamente. El extracto H-387-07-GISeM es el que más aumenta el porcentaje de cuerpos apoptóticos en la línea celular P388 con un 65%. La línea celular J774 tratada con los extractos de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* el porcentaje de cuerpos apoptóticos está entre 13% y 15.5% de las células totales (Tabla 5).

Tabla 5.- Porcentaje de cuerpos apoptóticos.

TRATAMIENTO	Cuerpos apoptóticos (%)	
	P388	J774
Vehículo	0.5 ± 0.71	0 ± 0
S. H-387-07-GISeM	65 ± 9.90	13 ± 4.2
<i>S. chinantlense</i> CE	28.5 ± 2.12	15.5 ± 0.7
<i>S. chinantlense</i> SE	44 ± 7.07	9 ± 1.4
<i>S. compositum</i>	41 ± 1.57	13 ± 4.2
Ara-C	51 ± 6.36	72 ± 4.2

Tabla 5.- Cuerpos apoptóticos inducidos en las líneas leucémicas P388 y J774 después de 48 h de tratamiento con la IC₅₀ de H-387-07-GISeM, *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y Ara-C 5 µM.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A pesar del avance en el conocimiento del cáncer a nivel celular, molecular, bioquímico y fisiológico, así como el uso de este conocimiento en el diagnóstico y la implementación de terapias, en los últimos años se ha convertido en la primera causa de muerte a nivel mundial (Tallman 2005, INEGI 2010), con incremento en el diagnóstico de nuevos casos clínicos a nivel mundial (WHO 2007). Por lo anterior sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo nuevos medicamentos. De los 141 medicamentos que se usan para tratar diferentes tipos de cáncer, el 67% son derivados de una u otra forma de productos naturales (Newman *et al.*, 2007), incluyendo a los de origen vegetal.

La familia *Curcubitaceae* ha mostrado ser de interés biomédico, ya que algunas especies de esta familia tienen compuestos con actividad antitumoral (Bruneton, 1991; Lavie *et al.*, 1971). Por ejemplo, *Wilbrandia sp.* mostró efecto antitumoral *in vivo* y capacidad citotóxica *in vitro* (Almeida *et al.*, 1991). Por otra parte se reporto actividad citotóxica del extracto etanólico de *Cucumis dipsaceus* Wender Steud, sobre las líneas tumorales K-562 y Hep-2 (leucemia mieloide crónica y carcinoma epidérmal de laringe respectivamente) debido al contenido de esteroles, triterpenos y flavonoides (Ukiya *et al.*, 2002).

El género *Sechium* pertenece a la familia *Curcubitaceae*, *Sechium edule* (Jacq) Sw. es la especie cultivada más estudiada debido a su importancia desde el punto de vista económico, alimenticio y en la medicina tradicional. Estudios fitoquímicos han revelado que los extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de *Sechium edule* (Jacq) Sw. contienen fenoles, alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroles y terpenos (Yen, *et al.*, (2001); Salama *et al.*, 1986; Siliciano, 2004), moléculas que aisladas de otras plantas han mostrando tener propiedades anticancerígenas (Cragg *et al.*, 2005). También se determinó que los frutos de *Sechium edule* (Jacq) Sw. contienen Sechiumina, la cual es una proteína que inhibe la actividad ribosomal en HeLa (línea celular de cáncer cérvico-uterino) (Tsann *et al.*, 1998).

Nuestro grupo de trabajo ha mostrado que extractos crudos obtenido de los frutos de ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. inhiben la proliferación de las líneas

cancerígenas de ratón P-388 (leucemia mieloide) pero solo algunas lo hacen sobre L-929 (fibrosarcoma de pulmón) (Salas y Torres, 2007).

En este trabajo se muestra que extractos crudos de frutos de *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM inhiben la proliferación en forma dosis-dependiente de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774 (Figura 4, 6, 7 y 8). Este hecho aunado a que *Sechium edule* (Jacq) Sw., inhibe la proliferación de líneas de células leucémicas de ratón indican que este género puede compartir fitoquímicos con potencial antitumoral.

El potencial antitumoral de cada extracto se refleja en la IC_{50} , así *S. chinantlense* SE tuvo una IC_{50} de 0.98 y 0.26 $\mu\text{g/mL}$, el de H-387-07-GISeM fue 1.39 y 0.61 $\mu\text{g/mL}$, el de *S. chinantlense* CE 2.32 y 2.17 $\mu\text{g/mL}$, y para *S. compositum* fue de 2.75 y 1.96 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular P388 y J774 respectivamente (Tabla 1), comparado con la IC_{50} mayor a 400 $\mu\text{g/mL}$ de *Sechium edule* (Jacq) Sw. en P388 (Salas y Torres, 2007), lo cual indica que los extractos evaluados en este trabajo, en el peor de los casos para P388, por lo menos es 150 veces más potentes que los provenientes de *Sechium edule* (Jacq) Sw.

Llama la atención el potencial antiproliferativo de los extractos aquí evaluados si se considera que el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos establece que los extractos crudos con IC_{50} menor a 20 $\mu\text{g/mL}$ son agentes con potencial anticancerígeno (Boik, 2001). Nuestros extractos no solo están en este rango sino que incluso cumplen el mismo criterio de interés oncológico como si se tratara de moléculas puras cuyo nivel de IC_{50} es menor a 4 $\mu\text{g/mL}$ (Boik, 2001), de hecho todos nuestros extractos evaluados están por debajo de estos niveles. Incluso son mucho más potentes que el extractos de *Terminalia catappa* L. que tiene actividad antiproliferativa sobre un carcinoma de pulmón humano (A549) en concentraciones mayores de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se consideró como un potencial antimetastásico (Chu *et al.*, 2007). Los extractos fenólicos de *Pinus massoiiana* Lamb., inhibieron el crecimiento de células de cáncer de mama (MCF-7 y HELF), en un rango de concentraciones de 3.5 a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Limei *et al.*, 2008). El extracto de hojas de *Polyalthia longifolia* (Sonn) Thw, mostró potencial anticancerígeno sobre una línea celular de cáncer de colon humano (SW-620) con una IC_{50} de 6.1 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, el uso de la IC_{50} de cada extracto obtenida para cada línea celular, para evaluar su efecto sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón, revela que la proliferación se reduce en menos del 50% con respecto a los controles (Figura 9), pero la viabilidad celular es cercana al 100 % (Tabla3). Interesantemente la IC_{50} establecida para P388 y usada sobre la misma línea, la viabilidad celular se reduce en forma significativa, concentración que siempre fue mayor a la requerida para frenar la proliferación de J774 (Tabla 2), esto significa que las células normales son más tolerantes a la presencia del extracto, lo cual sugiere una posible selectividad de la actividad citotóxica para las células tumorales.

El decremento de la viabilidad se puede explicar por la activación de la apoptosis. El uso de las IC_{50} para cada extracto y línea celular, sobre la misma línea celular, se encontró que P388 y J774 muestran evidentes cambios morfológicos tales como aumento del volumen celular, modificación en el tamaño citoplasma-núcleo, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación en algunas células, fragmentación nuclear con membrana celular intacta y formación de cuerpos apoptóticos (Figura 10 y 11); cambios citomorfológicos compatibles con el proceso de apoptosis y que son parámetros vigentes para evaluar este tipo de muerte celular (Ling *et al.*, 1993; Song *et al.*, 2005; Zalacain *et al.*, 2005; Fenech, 2007). La evaluación del porcentaje de cuerpos apoptóticos muestra aumento significativo en presencia de extractos de *Sechium* en comparación con los controles (Tabla 5). Por lo anterior es evidente que los extractos de *Sechium* culminan en la inducción de apoptosis, aunque al igual que en la mayoría de las pruebas para evaluar muerte por apoptosis es necesario analizar otro evento de este proceso en tiempo y forma como puede ser fragmentación de ADN y/o Annexina V, para reforzar las evidencias de inducción de apoptosis mediado por los extractos.

Aunque, como ya se mencionó, se conocen algunos compuestos presentes en frutos de *Sechium edule* (Jacq) Sw., es importante caracterizar en mayor medida los fitoquímicos que se encuentran en los extractos crudos. De esta manera se determinará si la actividad biológica es exclusiva de un compuesto específico, ó es la suma del conjunto de moléculas con propiedades anticancerígenas, aunque estudios recientes indican que el uso de extractos crudos exhiben mejor actividad antitumoral que el principio activo aislado y que incluso sinergizan con la actividad de

antineoplásicos clásicos con la consecuente reducción de los efectos secundarios (Sharabani *et al.*, 2006). Un tema de investigación abierto y que debe abordarse en un futuro empleando nuestros extractos.

CONCLUSIONES

- Los extractos de *S. chinantlense* CE, *S. chinantlense* SE, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISeM inhibe la proliferación celular de forma dosis-dependiente en las líneas leucémicas de ratón P388 y J777, siendo el extracto de *S. chinantlense* SE el que más potencial antiproliferativo tiene.
- La IC₅₀ de los extractos de cada línea celular reduce aproximadamente el 50% la densidad celular en cultivos de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón. Excepto la IC₅₀ de *S. chinantlense* SE H-387-07-GISeM para J774 que solo reducen un 20% la proliferación de médula ósea.
- Los extractos de las especies de *Sechium* disminuyen significativamente la viabilidad en la línea leucémica P388 y en menor medida a las células de J774, pero no afecta la viabilidad de médula ósea.
- La IC₅₀ de cada extracto para cada línea celular induce la formación de cuerpos apoptóticos en las líneas leucémicas P388 y J774.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour A., Ramirez C., Emgelmann F. (2002). Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía Mesoamericana*. 13:147-151.
- Afifi M., Ross S., Sohly M., Naeem Z., Halaweish F. (1999). Cucurbitacins of *Cucumis profetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chemical Ecology*. 25:847-859.
- Alfaro M., García C., Dueñas G. (2000). Métodos de detección de la apoptosis; aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 46:275-280.
- Almeida F., Rao V., Matos M. (1991). Antiinflammatory, antitumor and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacin glycosides from *Wilbrandia* species. *Phytotherapy Research*. 6:189-193.
- Anesini C., Ferraro G., Lopez P., Borda E. (2001). Different intracellular signals coupled to the antiproliferative action of aqueous crude extract from *Larrea divaricata* Cav. and nor-dihydroguaiaretic acid on a lymphoma cell line. *Phytomedicine*. 8:1-7.
- Balunas J., Kinghorn A. (2005). Drugs discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 78:431-441.
- Bellantuono I. (2004). Haemopoietic stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36:07–620.
- Boik J. (2001). *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, Pág. 25

- Bruneton J. (1991). Elementos de fitoquímica y farmacognosia. ED. Acribia S.A. Mexico. Pg 343.
- Bueno R., Moura S., Fonseca O. (1970). Preliminary studies on the pharmacology of *Sechium edule* leaves extracts. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 40:285-289.
- Cadena I., Arévalo G., Avendaño A., Soto H., Ruiz P., Santiago O., Acosta R., Cisneros S., Aguirre M., Ochoa M. (2007). Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq) Sw. Fresh Produce. ED Global. Science Books.1:41-53.
- Cadena I. (2005). Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Pág. 102.
- Che C., Fang X., Phoebe C., Kiunghorn A., Farnsworth N. (1985). High-field ¹H-NRM spectral analysis of some cucurbitacins. Journal of Natural Products. 48:429-434.
- Chu S., Yang C., Liu S., Kuo W., Chang Y., Hsieh Y. (2007). In vitro and in vivo antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. Food and Chemical Toxicology. 45:1194-201.
- Civin C., Gore S. (1993). Antigenic analysis of hematopoietic: a review. Journal of Hematotherapy. 2:137-144.
- Cousar J. (1999). The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Principles of diagnosis En: Lee G., Foerster J. Lukens J. Paraskevas F. Greer J. Rodgers G. Wintrobe's Clinical Hematology. 10^a ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. Pág. 1472-1475.
- Cragg G., Newman D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. The Journal of Ethnopharmacology. 100:72-79.

- Cumano A., Godin I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *The Annual Review of Immunology*. 25:745–85.
- Díaz M. (2007). *Hematología: actualización 2007*. ED AMEH A.C. México. Pág. 4
- Dubin M., Stoppani A. (2000) Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina*. 60:375-386.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35:495–516.
- Engelhardt M., Lubbert M., Guo Y. (2002). CD34+ or CD34-: which is the more primitive?. *Leukemia*. 16:1603-1608.
- Estey H. (2009). Treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 94:10-16.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2:1084-1104
- Fink S., Cookson T. (2005). Apoptosis, pyroptosis and necrosis. Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 4:1907-1916.
- Flick G., Burnette F., Aung L., Ory R., Angelo A. (1978). Chemical composition and biochemical properties of mirlitons (*Sechium edule*) and purple, green and white eggplants (*Solanum melongena*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26:1000-1005.
- Flores E. (1989). El chayote, *Sechium edule* Swartz (Curcubitaceae). *Revista de Biología Tropical*. 37:1-54.
- Gillies R., Didier N., Dentosn M. (1986). Determinations of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*. 159:109-113.

- Godin I., Cumano A. (2005). Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *The International Journal of Developmental Biology*. 49:251-257.
- Gutiérrez M. (2006). Síndromes hematológicos. Su relación con las enfermedades que lo producen. ED Prado. Pág. 473-491.
- Hernandez X. (1985). *Biología agrícola*. ED CECSA. Pág. 66.
- Hirose A. Ikejima T. Gill D. (1985). Established macrophage-like cell line synthesize interleukin-1 in response toxic shock syndrome toxin *Infection and Immunity*. 50:765-770.
- Hughes J. Wickramasinghe E. (1991). *Lecture notes on hematology*. ED Blackwell Scientific Publications. Pág. 216.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía). (2010). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. *Datos Nacionales*. Pág. 3.
- Jandl J. (1991). *Blood: Pathofisiology*. ED Blackwell Scientific Publications, Inc. Pág. 93.
- Jiménez G. (2003). *Biología celular y molecular*. ED Pearson educación. México. Pág. 912.
- Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*. 22:100-106
- Kantarjian H., Dixon D., Keating M., Talpaz M., Walters R., McCredie K., Freireich E. (1988). Characteristics of accelerate disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 61:1441-1446.
- Koren H., Hanwerrger B., Wunderlich J. (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a culture murine tumor line. *The Journal of Immunology*. 114:894-897.

- Kroemer G. Galluzzi L. Vandenabeele P. Abram J. Alnemri E. Baehrecke M. Knight R. Kumar S. Lipton S. Malorni W. Nuñez G. Peter M. Tschopp J. Yuan J. Piacentini M. Zhivotovsky B. Melino G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*. 12:1463–1467.
- Kueng W., Silber E., Appenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*. 182:16-19.
- Kyba M., Perlingeiro R., Daley G. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell Press*. 109:29–37.
- Labardini J. (2006). Leucemia aguda mieloblástica. *Hematología actualización*. ED AMEH A.C. Pág. 63-66.
- Lavie D., Glotter E. (1971). The cucurbitanes a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschritteder Chemie Organischer Naturstoffe*. 29:306-364.
- Limei Y., Mouming Z., Jin W., Chun C., Bao Y., Yueming J., Qiangzhong Z. (2008). Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana Lamb*) bark. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9:122-128.
- Ling Y., Priebe W., Perez S. (1993). Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Research*. 53:1845-1852.
- Lira S. (1996). Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of plant genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. International Plant Genetic Resources Institute. Italy. Pág. 58.

- Lira R., Castrejon J., Zamudio S., Rojas C. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*. 49:47-61.
- Li J., Yuan J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27:6194–6206.
- Lozoya X. (1980). Mexican medicinal plants used for treatment of cardiovascular diseases. *The American Journal of Chinese Medicine*. 8:86-95.
- Löwenberg B., Downing J., Burnett A. (1999). Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 341:1051-1062.
- Mayani H. (2009). Células troncales y hematopoyesis. Ed. Mensaje bioquímico. Facultad de Medicina, UNAM. Vol XXXIII.
- Mayani H., Flores-Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J., Flores-Guzmán P., Chávez-González A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*. 2:95-107.
- McGrath E., Palis J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Experimental Hematology*. 33:1021-1028.
- Metcalf D. (2001). Some general aspects of hematopoietic development. hematopoiesis. A developmental approach. ED Oxford. Pág. 3-14.
- Monroy V., Soto H., Cadena I., Santiago O., Ruiz P., Rosas A. (2009). Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencias*. 43:777-790.
- Munkey R., Hiller E., Paquette R. (1998). Modern hematology. Biology and clinical management. ED Human Press. Pág. 369.
- Newman J., Cragg M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 70:461-477.

- Ordoñez A., Gomez J., Vattuone M., Isla M. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq) Swartz extracts. *Food Chemistry*. 97:452-458.
- Passegue E., Jamieson H., Ailles E., Weissman L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:11842–11849.
- Potten C., Wilson J. (2004). *Apoptosis; the life and death of cell*. Cambridge University Press. Pg XII preface. USA. Pág. 216.
- Ralph P., Moore M., Nilsson K. (1976). Lisozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell line. *The Journal of Experimental Medicine*. 143:1528-1533.
- Ralph P., Nakoinz I. (1977). Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Research*. 37:546-50.
- Rzedowski J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 14:3-21.
- Ribeiro R., Barros F., Fiuza M., Muñoz C., Chieia S., Wanderley G., Gomes C., Trolin G. (1988). Acute diuretic effects in conscious rats, produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology*. 24:9-29.
- Rodel J., Link D. (1996). Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood*. 87:858-864.

- Salama M., Polo N., Contreras M., Maldonado R. (1986). Análisis fitoquímicos preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de *Sechium edule*. Revista Colombiana. 15:79-82.
- Salas M., Torres M. (2007). Efectos de extractos de diferentes variedades de chayote *Sechium edule* en la proliferación de diferentes líneas tumorales. Reporte de servicio social. Carrera de Biología, FES-Zaragoza, UNAM.
- Scientific Data Center for the Atomic Bomb Disaster, Nagasaki University (2006). <http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/n50/disaster/medical-E.html>.
- Seifried H., Anderson D., Fisher E., Milner J. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. The Journal of Nutritional Biochemistry. 18: 567-79.
- Seong C., Hyun H., Hwi Y., Sang H. (2007). Facile synthesis of trisaccharide moiety corresponding to antitumor activity in triterpenoid saponins isolated from *Pullsatilla* roots. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 55:1734-1739.
- Setzer W., Setzer M. (2003). Plant-derived triterpenoid as potential antineoplastic agents. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 3:540-556.
- Shabtay A., Sharabani H., Barvish Z., Kafka M., Amichay D., Levy J., Sharoni Y., Uskokovic M., Studzinski G., Danilenko M. (2008) Synergistic antileukemic activity of carnosic acid-rich rosemary extract and the 19-nor gemini vitamin D analogue in a mouse model of systemic acute myeloid leukemia. Oncology 75:203-214
- Sharabani H., Izumchenko E., Wang Q., Kreinin R., Steiner M., Barvish Z., Kafka M., Sharoni Y., Levy J., Uskokovic M., Studzinski G., Danilenko M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. International Journal of Cancer. 118:3012–3021.

- Sharpless E., De Pinho A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 8:703-713.
- Seifert G., Jesse P., Laenglerc A., Reindla T., Lütha M., Lobitza S., Henzea G., Prokopa A., Lodeb H. (2008). Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Letters*. 264:218-228
- Siliciano T., Tommasi N., Morelli I., Braca A. (2004). Study of flavonoids of *Sechium edule (Jacq) Swartz* (Cucubitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:6510-6515
- Song M., Gao S., Du K., Xu M., Yu Y., Zhou Y., Wang Q., Chen Z., Zhu Y., Chen G. (2005). Nanomolar concentration of NSC606985, a camptothecin analog, induces leukemic-cell apoptosis through protein kinase C(delta)-dependent mechanisms. *Blood*. 105:3714-3721.
- Tallman M., Gilliland D. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 106:1154-1163.
- Tanaka S., Saito K., Reed J. (1993). Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein, addition of e heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2b protein restores function as a regulator of cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:10920-10926.
- Tsann P., Jung Y. (1998). Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* Swartz; Purification, characterization, molecular cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*. 255:400-408.
- Ukiya M., Akihisa M., Tokuda H., Yoriyumi M., Mukainaka T., Banno N., Kimura Y., Hasegawa J., Nishino H. (2002). Inhibitory effects of cucubitanes glycosides and other triterpenoids from the fruit of *Monordia grosvenori* on Epstein-Barr

- virus early antigen induced by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:6710-6715
- Vega A., Velasco L. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*. 31:97-111.
 - Vicanco J., Cosio E., Loyola H., Flores H. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación Ciencia*. 2:68-75.
 - Wakelin L., Adams A., Hunter C., Waring J. (1981). Interactions of crystal violet with nucleic acids. *American Chemical Society*. 20:2779-2787.
 - Wognum A., Eaves A., Thomas T. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research*. 34:461-475.
 - World Health Organization. (2007). *World Health Statistics*. Francia. Pág.13.
 - Yamai H., Sawada N., Yoshida T., Seike J., Takizawa H., Kenzaki K., Miyoshi T., Kondo K., Bando Y., Ohnishi Y., Tangoku A. (2009). Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *International Journal of Cancer* 125:952–960.
 - Yen G., Chen H., Peng H. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*. 39:1045-1053.
 - Yin T., Li L. (2006). The stem cell niches in bone. *The Journal of Clinical Investigation*. 116: 1195-1201.
 - Yorder M. (2001). Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 98:3-5

- Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28:227-236.

- Zambrano I., Santiago O., Weiss S., Caseres C. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Revista de Investigación Clínica*. 51:53-66.

APÉNDICE I

“Preparación de reactivos”

Obtención de extractos

Se utilizaron 1 Kg de frutos de madures hortícola colectados *in situ* en el banco de germoplasma del grupo GISeM ubicado en Huatusco, Veracruz.

Los frutos se cortaron en trozos pequeños, secados a 50 °C con circulación de aire y macerados para estandarizar el tamaño de partícula. Se mezcló con metanol al 96% y se dejó reposar por 48 h a temperatura ambiente (20 °C ± 2). La mezcla se decantó y se filtró por 12 ocasiones renovando el disolvente hasta agotar los componentes solubles. Posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener el extracto crudo.

Dilución de extractos

Se pesan 71.2 mg del extracto crudo y se coloca en un eppendorf, nuevo, estéril y etiquetado al cual se le adicionan 40 µL de etanol al 96%. El vial se agita vigorosamente en un vórtex (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) para facilitar la solubilización del extracto.

Aforar a 1ml con Solución Buffer de Fosfatos (PBS) y agitar en el vórtex para homogenizar la muestra. Centrifugar (Beckman, TJ-6, USA) el extracto solubilizado a 2000 rpm durante 5min, se colecta el sobrenadante en un eppendorf nuevo y se etiqueta como stock 1.

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

Del stock 2 se toman 0.4, 2, 4, 10 y 20 µL que corresponden a 40, 230, 470, 1180 y 2370 µg/ml para realizar los ensayos biológicos.

Para preparar un stock mas diluido, se toman 12.5 μL del stock 2 y adicionar 725 μL de PBS para formar el stock 3. Del stock 3 se toman 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 μL que corresponden a 1.2, 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ para realizar los ensayos biológicos.

Para obtener las dosis empleadas en la curva dosis-dependientes, se toman 50 μL del stock 3 y adicionar 750 μL de PBS para formar el stock 4. Del stock 4 se toman 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20 μL que corresponden a 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ para realizar los ensayos biológicos.

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

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

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

- 1 L de Agua bidestilada.
- 1 sobre de IMDM, aprox. 17.7g
- 3.024g Bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3)
- 0.031g Penicilina-Estreptomicina

El sobre de IMDM se disuelve poco a poco en 800 ml de agua bidestilada, una vez disuelto completamente se adiciona el bicarbonato de sodio, aforar a 1L y dejar en agitación por 15 min. La solución se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA) con diámetro de 0.22 μm , en un ambiente estéril. Vaciar a botellas estériles, adicionar la Penicilina-Estreptomicina. Almacenar a 4°C.

SFB (Suero Fetal Bovino)

El SFB se inactiva antes de usarse. Para la inactivación se deja a temperatura ambiente hasta su descongelación, posteriormente se pone en un baño de agua a 56°C por 30 min con el propósito de inactivar proteínas del complemento y se homogeniza suavemente cada 10 min. Se Almacena a -20°C.

PBS (solución buffer de fosfatos)

Esta solución de sales de fosfato conserva la fisiología celular. Para preparar 1L de PBS se necesitan:

- 1L Agua bidestilada
- 8.0g Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA)
- 0.2g Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA)
- 2.16g Fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄) (Sigma, Chem, USA)
- 0.2g Fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) (Sigma, Chem, USA)

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

Verseno

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

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

En 800 ml de agua bidestilada se agregan cada uno de los reactivos hasta su disolución completa. Aforar a 1L y corroborar que el pH sea de 7.3.

En caso de ser básico utilizar HCl 1N y si es ácido ocupar NaOH. Se esterilizarla por autoclave, se dejar enfriar y almacenar a 4°C.

Glutaraldehído al 1%

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

Cristal violeta 1%

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

Ácido acético al 10%

Para realizar 100 ml de solución, se toman 90 ml de agua bidestilada y se le agregan 10 ml de ácido acético glacial.

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

APÉNDICE II

Ecuaciones de regresión lineal para obtener la IC₅₀

P-388		
Extracto	Ecuación	IC ₅₀
H-387-07-GISeM	$y = -0.450x + 1.209$ $R^2 = 0.964$	1.39
<i>S. chinantlense</i> CE	$y = -0.096x + 0.644$ $R^2 = 0.843$	2.54
<i>S. chinantlense</i> SE	$y = -0.415x + 0.809$ $R^2 = 0.965$	0.98
<i>S compositum</i>	$y = -0.111x + 0.804$ $R^2 = 0.760$	2.75
J-774		
Extracto	Ecuación	IC ₅₀
H-387-07-GISeM	$y = -0.413x + 0.551$ $R^2 = 0.822$	0.61
<i>S. chinantlense</i> CE	$y = -0.122x + 0.515$ $R^2 = 0.962$	2.17
<i>S. chinantlense</i> SE	$y = -166.0x + 95.29$ $R^2 = 0.954$	0.26
<i>S compositum</i>	$y = -0.158x + 0.661$ $R^2 = 0.963$	1.96