



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS DIFERENTES
EXTRACTOS DE AGAVE PITZOMETL EN CÉLULAS DE CÁNCER
CERVICOUTERINO CaSki.**

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

David Adrián López Luna

M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez.
Director de tesis

Q.F.B Gerardo Díaz Vázquez
Asesor de tesis

Ciudad de México

Noviembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS.

A mi madre **Blanca Estela Luna Evaristo** por todos sus cuidados, preocupaciones, apoyo, cariño, amor, confianza, por ser mi consejera y confidente, una madre y amiga, gracias por todo, te amo con todo mi ser.

A mi padre **David López Avalos** que de un modo muy especial me dejó ser quien yo quisiera ser, sin prejuicios ni regaños, pero apoyándome en todo y dejándome elegir mi camino, sabiendo de antemano que sería el correcto, muchas gracias por tu confianza.

A **Cristabel Ramírez García** por ser quien me motiva a ser mejor cada día para poder verme a través de sus ojos, por enseñarme a amar, a ser feliz y superar cualquier adversidad, por acompañarme, por amarme, por aceptarme como soy, por ser mi compañera, mi amiga, mi amante, mi luz, con quien quiero compartir toda mi vida. Gracias por existir, te amo intensamente.

A mi familia y en especial a mi abuelita **Susana Evaristo** quien siempre preocupa por mi bienestar, se alegra por mis logros y me anima a crecer, gracias por tus consejos, cariño y cuidados.

A **Dulce Anahi Gonzales Hernández** por ser mi amiga incondicional por escucharme siempre, animarme, compartir esos momentos de diversión, alegría, confusión, miedos, viajes, canciones, amigos, risas, carcajadas, gracias por ser mi mejor amiga.

A mi amigo **Carlos Ortiz Ayala** que sin las palabras más extensas o consejos complicados siempre tiene la manera más divertida de expresar que todo estará "bien", gracias por estar siempre que te necesito como solo un verdadero amigo sabe hacerlo.

A mis amigos que sin ellos mi vida escolar hubiera sido callada y solitaria, a **Yadir Campos** por compartir todos esos versos de vida, a **Victoria Chávez** por no dejarme solo e incluirme en sus equipos y sus saludos diarios, a **Gerardo García** a quien me encuentro entre clases, me acompaña y me recuerda las materias que recursa y a **Daniela Romero** por aconsejarme de la manera más realista.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores porque sin ellos no estaría aquí escribiendo estos agradecimientos de tesis, que me brindaron su conocimiento, experiencia, consejos, regaños, apoyos, que abrieron mi mente a nuevos horizontes y me ensañaron a aprender.

Al profesor **Rodolfo Carreón Sánchez** quien me brindo su tiempo, paciencia y experiencia para dirigir y coordinar esta tesis.

Al profesor **Gerardo Díaz Vázquez** quien me asesoro e instruyo en el manejo de cultivos celulares, resolvió mis dudas y corrigió mis errores.

Al profesor **Luis Sánchez Sánchez** que me permitió trabajar en el laboratorio de biología celular y siempre se preocupo por resolver mis dudas, ayudarme a interpretar mis resultados y asesorarme siempre que lo necesite.

También quiero hacer un agradecimiento muy especial a aquellos profesores quienes hicieron que me gustara aún más mi carrera por la manera tan excelente de dar sus clases, con verdadera vocación.

Al profesor **Iker Escalona** de síntesis de fármacos y además por la revisión de este trabajo. A la profesora **Esperanza Jiménez** de evaluación de fármacos, a la profesora **Pilar Santos** de biología celular, al profesor **Vicente Hernández Abad** de biofarmacia y a la profesora **Sandra Ortega** de ciencia básica, muchas gracias por todas sus enseñanzas.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por formarme como profesionista y ser mi hogar detenido en el tiempo.

De todos los átomos que puede haber, todos los enlaces que pueden formarse, todas las interacciones que pueden ocurrir, todas las condiciones, todos los ambientes que pueden darse, estamos aquí, en la tierra, viviendo a partir de la evolución de una interacción molecular capaz de reproducirse, especializarse y divergir de tal manera que pudo generar todas las especies, nuestro ancestro en común ubica a todos los seres vivos como hermanos, los humanos no somos el centro o el final de la cadena evolutiva, si tan solo ocupáramos el lugar que nos corresponde, somos única la especie que puede comprender el complicado proceso de la vida, somos la especie que puede protegerla y es lo que quiero ser, un protector de la vida y la ciencia es el camino que he encontrado para serlo.

David Adrián López Luna

ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer cervicouterino.
VPH	Virus de papiloma humano.
HeLa	Línea celular de cáncer cervicouterino con VPH 18.
CaSki	Línea celular de cáncer cervicouterino con VPH 16.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
CCD	Cromatografía de capa delgada.
Rf	Factor de retención.
UV	Ultra violeta.
p53	Gen regulador de apoptosis.
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein / Proteína de dominio de muerte asociada al factor de necrosis tumoral receptor tipo 1.
FADD	Fas -Associated protein with Death Domain / Proteína asociada con en dominio Fas de muerte.
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 / Linfoma de células B2 protooncogén que codifica proteínas de muerte apoptótica.
BH3	Interacting-domain death agonist / Agonista de la interacción con la región de muerte, proteínas proapoptóticas con dominios de homología.
Bax	Bcl-2 associated X protein/ Proteína X asociada a Bcl-2.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
LDH	Lactato Deshidrogenasa.
INT	Yodonitrotetrazolio.
Kit CytoTox 96	Estuche de ensayo de citotoxicidad no radioactivo.
RPMI-1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute.
PBS	phosphate buffer solution/ buffer de fosfatos.
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

CONTENIDO

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco Teórico.....	4
3.1 Plantas medicinales.....	4
3.2 Farmacognosia.....	4
3.2.1 Recolección.....	5
3.2.2 Conservación.....	5
3.2.3 Extracción de principios activos.....	5
3.2.3.1 Extracción mecánica.....	5
3.2.3.2 Extracción con disolventes.....	6
3.2.3.3 Destilación.....	6
3.2.3.3.1 Destilación a presión reducida.....	6
3.3 Separación.....	6
3.3.1 Cromatografía.....	7
3.3.1.1 Cromatografía en capa delgada.....	7
3.3.1.1.1 Adsorbentes y eluyentes.....	8
3.3.1.1.2 Determinación Rf.....	10
3.3.1.1.3 Revelado de placas.....	11
3.4 Plantas medicinales contra el cáncer.....	15
3.5 Agave.....	17
3.5.1 Agave marmorata.....	18
3.5.2 Metabolitos anticancerígenos del genero Agave spp.....	19
3.6 Cáncer.....	20
3.6.1 Características de las células cancerosas.....	21
3.6.2 Estadísticas de mortalidad del cáncer.....	21
3.6.3 Muerte celular.....	22
3.6.3.1 Apoptosis.....	22

3.6.3.2	Necrosis.....	23
3.6.4	Cultivo celular.....	24
3.6.5	Cáncer cervicouterino.....	26
3.6.6	Virus del papiloma humano.....	27
3.6.7	Tratamiento de cáncer cervicouterino.....	28
4.	Planteamiento del problema.....	32
5.	Hipótesis.....	33
6.	Objetivos.....	34
7.	Diseño experimental.....	35
8.	Reactivos, Material y Equipo.....	36
9.	Metodología.....	39
10.	Resultados.....	44
11.	Discusión de resultados.....	51
12.	Conclusiones.....	53
13.	Sugerencias.....	54
14.	Referencias.....	55

1. RESUMEN

En la actualidad los tratamientos contra el cáncer son invasivos, agresivos y provocan diversos efectos secundarios. Por lo cual, el encontrar alternativas más específicas y menos agresivas para su tratamiento ha sido una línea de investigación siempre activa.

Uno de los cánceres más diagnosticados en las mujeres es el cáncer cervical o cervicouterino (CaCu) para el cual una vez detectado, solo existen tres tipos de tratamiento: cirugía, quimioterapia y radioterapia, cuya elección dependerá del estado en que se encuentre el cáncer y el nivel de invasión a los tejidos circundantes o distantes.

Dentro de nuestro grupo de trabajo, estudios recientes demostraron que el agave pitzometl presenta un efecto antiproliferativo y no citotóxico sobre células de cáncer cervicouterino HeLa con una IC_{50} de 380 $\mu\text{g/mL}$.¹

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de seis diferentes extractos del agave pitzometl obtenidos mediante extracciones seriadas con disolventes de diferente polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua) y se logró encontrar actividad antiproliferativa en el extracto de diclorometano pero con efecto citotóxico del 35.65 % en células Caski de cáncer cervicouterio.

2. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es el nombre que se le da al proceso donde algunas células del cuerpo empiezan a dividirse y diseminarse sin control a tejidos circundantes o a otros tejidos del cuerpo.

Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Además se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años.²

Por otro lado, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre son el de pulmón, próstata, colon-rectal, estómago e hígado y en la mujer los de mama, colon-rectal, pulmón, cuello uterino y estómago.²

Por esta razón, el cáncer es una línea de investigación en continuo estudio para una mejor comprensión, prevención y tratamiento de esta enfermedad.

El cáncer de cuello uterino (CaCu) es el cuarto tipo de cáncer más frecuente y tiene la cuarta tasa de mortalidad en mujeres.³ La mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino se puede prevenir con exámenes de detección de rutina, inmunización o con el tratamiento de las lesiones precancerosas.⁴

Existen tres diferentes tipos de tratamientos estándar disponibles para las pacientes con cáncer de cuello uterino, la cirugía, quimioterapia y radioterapia y algunas veces el mejor plan de tratamiento incluye dos o más de estos métodos.⁴

Estos tratamientos en su mayoría son agresivos y provocan diversos efectos secundarios tales como: alteraciones en la médula ósea, corazón, riñones, fertilidad, cabello, piel y uñas, náuseas, vómitos, etc. Por esta razón en la actualidad se buscan compuestos que tengan actividad antitumoral y no citotóxica como una alternativa a los tratamientos tradicionales.

Una opción prometedora para el tratamiento del cáncer, son los distintos metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales, que han demostrado actividades antiproliferativas y no citotóxicas en células cancerígenas, lo cual es de gran importancia para el desarrollo de tratamientos con menos efectos secundarios y que mejoren la calidad de vida del paciente.⁶

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Plantas Medicinales

Desde tiempos remotos el hombre hizo uso de las plantas con fines alimenticios y medicinales, a partir de su propio instinto, observando el comportamiento de los animales y con base en el método de ensayo y error. De esta manera supo distinguir entre especies beneficiosas o dañinas y su conocimiento se transmitió de generación en generación, surgiendo así el primer eslabón de la medicina tradicional.⁷

La medicina tradicional es el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables y son utilizados en la prevención, diagnóstico o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.⁸

Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero se han analizado y estudiado los aspectos terapéuticos para precisar, comparar y clasificar sus propiedades. Además se busca conocer los principios activos, para determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis y proponer modificaciones estructurales que mejoren su actividad.⁹

3.2 Farmacognosia

La farmacognosia tiene por objetivo el estudio de la composición y los efectos de las sustancias de origen animal y vegetal. Además recolecta los datos sobre su origen, composición, aspecto botánico, cultivo, recolección, conservación, caracterización, actividad farmacológica y sus aplicaciones.¹⁰

Durante una investigación en sustancias de origen natural, se debe tener sumo cuidado en la recolección, transporte, almacenamiento y realización de los ensayos, con la finalidad de mantener intactas las propiedades farmacológicas. En el caso de las plantas se puntualizan las siguientes etapas:

3.2.1 Recolección

Factores como la estación del año, edad de la planta, cantidad de luz o humedad afectarán significativamente el rendimiento de los principios activos. Además la composición varía de acuerdo a la parte de la planta que se recolecte: planta completa, hojas, brotes, tallos, madera, corteza, flor, fruto, semillas o raíz.

El material recolectado debe procesarse lo más rápidamente posible para evitar el deterioro y contaminación, por lo tanto deben transportarse y mantenerse en un lugar fresco separado de otras sustancias o microorganismos.

3.2.2 Conservación.

Las plantas al recolectarse inician una serie de procesos degenerativos que se deben evitar para la conservación de los productos de interés.

Una operación útil para este fin es el secado con el cual se elimina la suficiente cantidad de agua para impedir la acción de enzimas y microorganismos. Así mismo, la refrigeración tiene el mismo efecto al operar a una temperatura menor a la requerida para los procesos degenerativos.

El secado puede realizarse por un proceso natural (sol), calor artificial, o liofilización para compuestos termolábiles.^{9, 10}

3.2.3 Extracción de los principios activos.

El objetivo es concentrar los principios activos del material vegetal, disolviéndolos selectivamente o separando la fase de la planta en donde se encuentre el componente de interés. Para ello se ocupan técnicas extracción mecánica, con disolventes o por destilación

3.2.3.1 Extracción mecánica.

Se utiliza para producir la salida del líquido (zumo) o secreciones (exudados) que contiene la planta. Puede realizarse por trituración, compresión o incisiones, los dos primeros obtienen el zumo de la planta al romper las membranas celulares

liberando el líquido que contienen y las incisiones recolectan el exudado realizando cortes en ciertas partes de la planta viva.

3.2.3.2 Extracción con disolventes.

Esta aprovecha las diferentes solubilidades de los compuestos. Consiste en colocar en contacto partes de la planta (fragmentadas, trituradas o en polvo) con un disolvente capaz de disolver los principios activos, obteniendo una transferencia selectiva desde el sólido hacia una fase líquida que posteriormente puede concentrarse eliminando el disolvente por destilación.¹¹

3.2.3.3 Destilación.

La destilación es una técnica de separación de las distintas sustancias de una mezcla líquida mediante la vaporización y condensación selectivas. Dichas sustancias, se separan aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de ellas, ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia, es decir, no varía en función de la masa o el volumen, aunque sí en función de la presión.¹¹

3.2.3.3.1 Destilación a presión reducida.

La destilación a presión reducida se utiliza cuando los puntos de ebullición de los disolventes son muy altos o existe material termolábil en la mezcla. Como sabemos, un líquido llega a su punto de ebullición cuando su presión de vapor iguala a la presión atmosférica o de operación. Por lo tanto si reducimos la presión de operación tendremos la ebullición a temperaturas más bajas que en condiciones normales.¹¹

3.3 Separación.

Es conveniente comentar que además de comprobar que los componentes de un producto natural sin tratamiento químico (extracto crudo) poseen el efecto farmacológico, además se debe aislar el principio activo para conocer su

concentración, su estructura y así procurar su síntesis o semisíntesis, para posteriormente continuar estudios farmacológicos sobre dicho compuesto.⁹

Para la separación de mezclas complejas la cromatografía es la técnica preferida por su gran versatilidad gracias a sus distintas variantes e instrumentación

3.3.1 Cromatografía.

La cromatografía es un método de separación de los diferentes componentes de una muestra, por medio de la interacción entre dos fases, la fase móvil que transportará la muestra y la fase estacionaria en donde las especies experimentan atracciones dependiendo de su afinidad, esto da lugar a interacciones repetidas entre las fases (repartos) y al final del proceso los componentes aparecen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria.¹²

Una amplia gama de selección de materiales para la fase móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. Esto se basa en la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases por el soluto y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London.¹³

3.3.1.1 Cromatografía de capa delgada

Cromatografía de capa fina CCD, es un método de análisis de mezclas mediante la separación de sus componentes. Se puede utilizar para determinar el número de componentes en una mezcla, monitorear el progreso de una reacción o determinar la identidad y la pureza de un compuesto ¹⁴

Normalmente las placas para CCD están soportadas en láminas de plástico, vidrio o aluminio las cuales están recubiertas con una delgada capa de un adsorbente (fase estacionaria). Para realizar un análisis preliminar, en primer lugar la muestra a analizar se solubiliza en un disolvente volátil para colocar una pequeña cantidad de esta disolución en el extremo de una placa de CCD, esto de tal modo que se encuentre aproximadamente a 1 cm separada de la base. Posteriormente la parte

inferior de la placa se sumerge en un recipiente cerrado que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil) y que no sobrepasan el punto de aplicación; a continuación el eluyente fluirá por acción separando la muestra a medida que asciende por la producción un reparto diferencial de los componentes de la muestra entre el disolvente y el adsorbente.¹⁴

3.3.1.1.1 Adsorbentes y eluyentes

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente poco polares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente.¹⁴

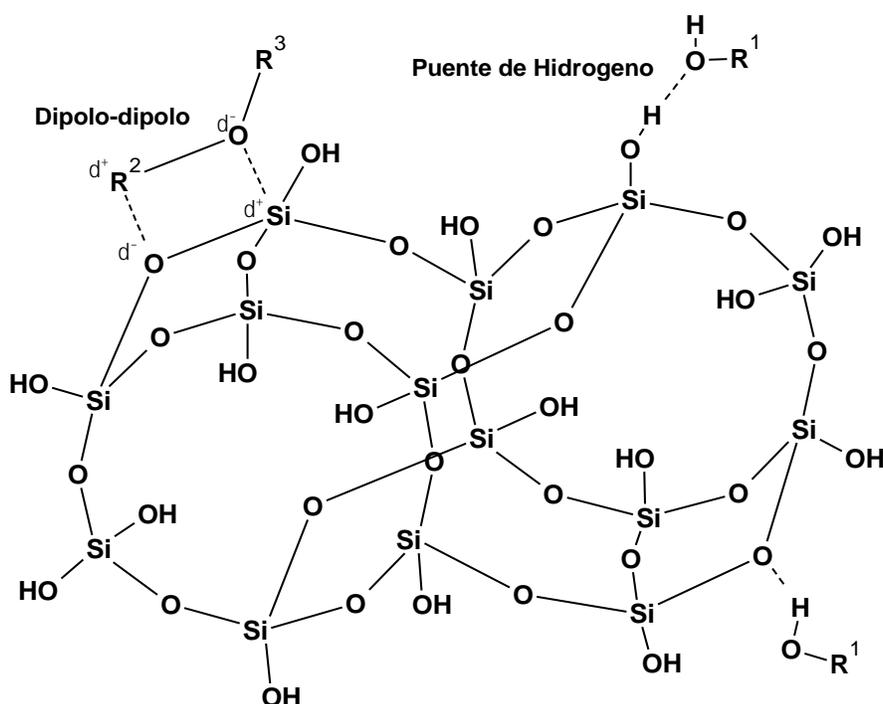


Imagen 1. Interacciones dipolo- dipolo y puentes de hidrogeno con el gel de sílice. Imagen tomada de: Carreño C. [Internet] Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011. [actualizado nov. 2011; consulta sep. 2015]. Cromatografía en Capa Fina Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/siguientes/practicas.htm>

La polaridad del eluyente afecta las velocidades relativas con las que los diferentes componentes de la mezcla se mueven en la fase estacionaria. Los disolventes polares compiten más eficientemente por los lugares polares del adsorbente. Por lo tanto, un disolvente polar desplazará las moléculas polares más rápidamente y generalmente habrá poca separación de los componentes de la mezcla. Si por el contrario el disolvente es muy apolar, no eluirán los compuestos polares. La CCD se utiliza para determinar y elegir el sistema de elución adecuado para cada separación.¹⁴ Como se observa en el cuadro 1.

Polaridad	Orden de elución de los compuestos	Actividad de los adsorbentes	Fuerza de elución de los disolventes
— ↓ +	Hidrocarburos saturados Hidrocarburos aromáticos Derivados halogenados Éteres	Celulosa	Éter de petróleo Ciclohexano Benceno Alcanos Tetracloruro de carbono
	Cetonas Aldehídos Éteres Alcoholes Aminas Ácidos	Sulfato de calcio Sílice Florisil Oxido de magnesio Alúmina	Diclorometano Cloroformo Éter dietílico
		Carbón activado	Acetona n-propanol Etanol Metanol Agua Ácido acético

Cuadro 1. Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía. Orden de elución, actividad de adsorbentes y fuerza de elución de los disolventes. Cuadro tomado de: Carreño C. [Internet] Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011. [actualizado nov. 2011; consulta sep. 2015]. Cromatografía en Capa Fina Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/siguientes/practicas.htm>

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite mayor fluidez. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y error".¹⁴

3.3.1.1.2 Determinación del R_f

La retención de los compuestos se debe a que las moléculas del soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil, esto en función de:

- La polaridad del compuesto: Determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los poco polares se eluirán con mayor facilidad.
- Naturaleza del disolvente: Para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde la base de la placa se conoce como R_f . Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa. Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión:

$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto X} / \text{distancia recorrida por el eluyente Y}$

Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a valores de 0.3-0.5. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente poco polar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano/metanol en distintas proporciones.¹⁵

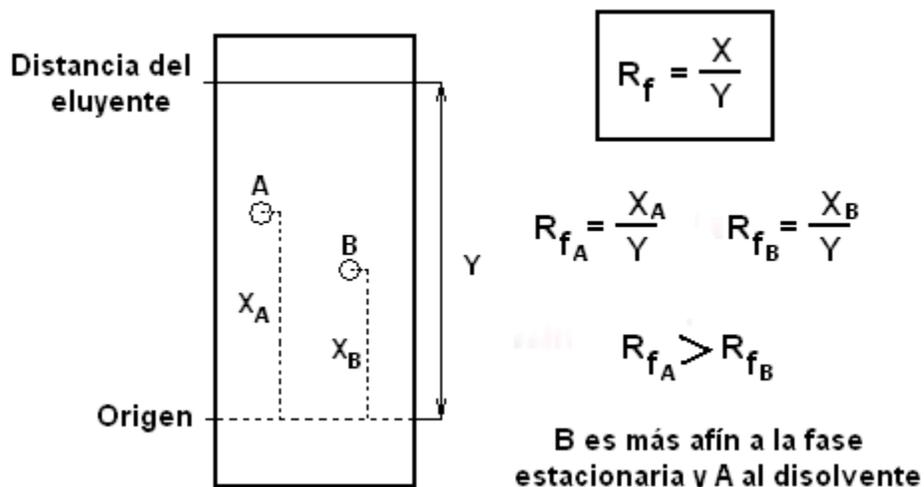


Imagen 2. Determinación del R_f en una placa cromatográfica. Imagen tomada de: Carreño C. [Internet] Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011. [actualizado nov. 2011; consulta sep. 2015]. Cromatografía en Capa Fina Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/siguientes/practicass.htm>

3.3.1.1.3 Revelado de placas

Si los compuestos separados no son coloridos, es necesario evidenciar su posición en la placa utilizando diferentes técnicas de revelado, que por su naturaleza se dividen en reveladores químicos y físicos

Reveladores químicos

Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados. Generalmente se utiliza un reactivo que forme productos o complejos coloreados con los componentes orgánicos.

Los vapores de sublimación de yodo revelan compuestos susceptibles a oxidarse generando coloraciones amarillo-marrón con los compuestos orgánicos, sin embargo, las manchas desaparecen al quitar el contacto con los vapores por lo que es necesario marcarlas.¹⁶

Reveladores físicos

El más común consiste en añadir un indicador fluorescente al absorbente. De tal forma que al colocar la placa bajo luz ultravioleta, dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, o en otros casos aparece toda la placa fluoresce excepto donde hay componentes.

Algunos compuestos poseen grupos cromóforos con lo que pueden ser detectados directamente con una lámpara ultravioleta.¹⁶

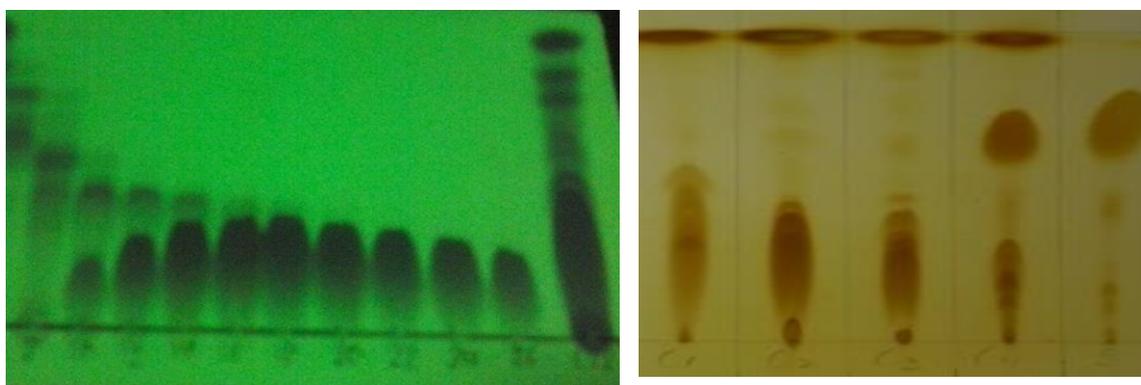


Imagen 3. Revelado por luz UV y sublimación de yodo. Imagen tomada Castro J, Vasconcelos A, França E, Souza T, Monteiro O, Camara M. Perfil de la variabilidad de los aceites de copaiba. 52° congreso brasileño de química. 2012. Disponible en: <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/394-13969.html>

Reveladores selectivos.

En un análisis fitoquímico, es común buscar compuestos con actividades biológicas tales como glucósidos, alcaloides, esteroides, saponinas, entre otros. Para esto se utilizan reactivos que reaccionan de manera específica con la estructura de estos componentes mostrando así su presencia o ausencia en la muestra a analizar.¹⁷ Algunos ejemplos son:

Revelador Dragendorff

Es un reactivo de tetrayodo bismuto de potasio que detecta la presencia de alcaloides por un precipitado naranja-rojizo cuando se adiciona una solución ácida de alcaloides.¹⁸



Imagen 4. Detección de diferentes alcaloides con el revelador Dragendorff. Imagen tomada de Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edn. Springer, Berlín. 1995

Disolución etanólica de KOH al 10%

Se utiliza para revelar la presencia de antraquinonas y se basa en la reacción de Bornträger en donde en un medio amoniacal la solución de KOH reacciona con los derivados antronas y cumarinas dando diferentes coloraciones en UV 365 nm.¹⁹

Antronas: Amarillo

Cumarinas: Azules

Furano y Piranocumarinas: Verdes

Antraquinona: Rojo-anaranjado



Imagen 5. Detección de cumarinas de los extractos de *Asperulae*, *Meliloti herba* y *Toncae semen* con revelador de KOH al 10% en etanol. Imagen tomada de Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edn. Springer, Berlin. 1995

Vainillina-ácido sulfúrico

La vainillina en presencia de ácido sulfúrico y oxígeno pueden formar colorantes triarilmetano que se cree son responsables de la coloración.

Los aldehídos son susceptibles a adiciones nucleofílicas y en presencia de un ácido de Brönsted (H_2SO_4) se favorece la resonancia polarizando al carbonilo, dando como resultado una gran reactividad con los compuestos adsorbidos por la placa, en presencia de calor resultan diversas condensaciones o adiciones con distintas gamas de color.²⁰

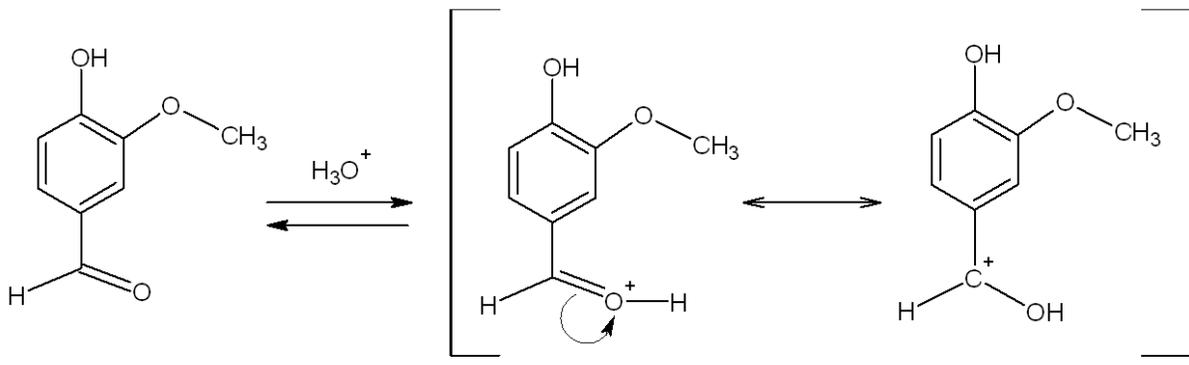


Imagen 6. Polarización del carbonilo. Reactividad de vainillina

Al ser un revelador muy reactivo con diferentes estructuras, la detección debe comparada con una referencia o posterior a una extracción selectiva de las estructuras que se desea revelar.¹⁹

Saponinas: Distintas coloraciones en el espectro visible (Vis)

Principios amargos rojo-café, amarillo-café o verde oscuro (Vis)

Aceites esenciales: Zonas azules, cafés o rojas (Vis)

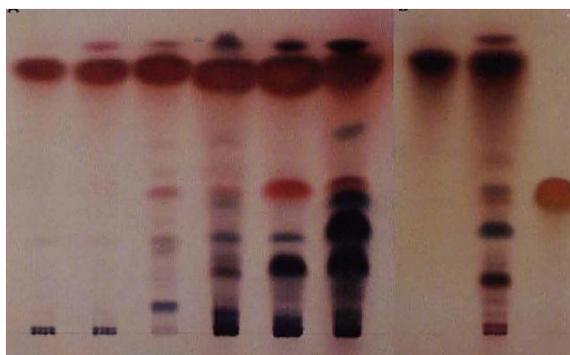


Imagen 7. Detección de anetol, metilcavicol o safrol en aceites esenciales de *Anisi fructus*, *Foeniculi fructus*, *Basicili herba*, *Sassafras lignum* con el revelador de vainillina-ácido sulfúrico. Imagen tomada de Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edn. Springer, Berlin. 1995

3.4 Plantas medicinales contra el cáncer.

Las plantas que crecen en condiciones adversas como suelos de bajos nutrientes, temperaturas extremas, radiación solar intensa y la escasez de agua, son particularmente susceptibles al ataque de especies reactivas de oxígeno y han evolucionado en sistemas de defensa anti oxidantes eficientes.²¹

Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones entre la planta y su ecosistema y generalmente se desarrollan como sistemas de defensa a los agentes patógenos y herbívoros, como los insectos y mamíferos, mientras que sus niveles en los tejidos de la planta se cree que son ambientalmente inducidos y controlados genéticamente. Los metabolitos de defensa imparten acción antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiviral, antihelmíntico, y antimutagénica por lo cual también pueden desempeñar un papel protector o curativo contra el cáncer o enfermedades crónicas como la diabetes, o de tipo neurodegenerativas.²¹

Los compuestos fenólicos (por ejemplo los ácidos fenólicos, flavonoides, y taninos) funcionan como aceptores de electrones de radicales libres o como quelantes de iones redox que dañan las membranas lipídicas por lo cual tienen un papel importante en la protección de estas estructuras inactivando así las especies reactivas de oxígeno.²¹

Las saponinas permiten a las plantas el almacenamiento y la conservación del agua y resistencia a los depredadores. Tienen propiedades detergentes y tensoactivas, ya que contienen una parte soluble en agua (azúcar) y subunidades solubles en grasa (sapogenina). El núcleo de sapogenina, de esteroides o triterpenoides, está unido por C3, a un hidrato de carbono de la cadena lateral soluble en agua. Como consecuencia de sus propiedades de superficie activa, saponinas forman espumas estables.²¹

Los mecanismos propuestos de las propiedades anticancerígenas de las saponinas incluyen efectos antioxidantes, citotoxicidad directa e indirecta a las

células cancerosas, la modulación inmune, la modulación del metabolismo de esteroides ácidos y neutros, y la regulación de la proliferación celular.²¹

Estudios recientes han indicado que las saponinas ofrecen una estrategia quimiopreventiva y antiproliferativa de cánceres humanos. Por ejemplo, las saponinas extraídas del *Agave lechugilla torr* que presentan una actividad antiproliferativa en la línea celular HeLa con una IC₅₀ de 89 µg/mL.²²

Por esta razón es importante continuar con el estudio y caracterización de los metabolitos secundarios de las plantas medicinales. Como son las género *Agave spp* las cuales han mostrado diversas actividades biológicas que fundamentalmente pueden constituir precursores de muchos medicamentos como hormonas sexuales, corticoides, diuréticos y antitumorales.⁹

3.5 Agave

El origen etimológico de la palabra “Agave” proviene del griego *Agavos* y significa “noble”. Desde el punto de vista de la botánica, el género *Agave* pertenece a la familia *Agavaceae*, esta familia presenta 23 géneros y 637 especies de las cuales 166 son del género *Agave* y están presentes en el continente americano, 75% de todas ellas se encuentran en México.²³

Características generales

Hojas: Producen hojas sésiles dispuestas en rosetas, lanceoladas, gruesas y fibrosas, de color blanco-azulado o blanco-grisáceo, amplias en la base y gradualmente acaban con un aguja fina, con margen generalmente aserrado o con espinas.

Flores: Están dispuestas en inflorescencias paniculadas o espigadas según la especie, que se forman en el centro de la roseta de hojas, sostenidas por un largo tallo que en algunas especies llega a los 2 metros de altura y cubiertas por numerosas brácteas.

Fruto: en forma de cápsula leñosa.

Semillas: numerosas, a veces planas o con forma de media luna o semicirculares.²³



Imagen 8. *Agave Americana* en floración. Imagen tomada de: Elcriso [Internet] Italia; 2008; [actualizado ago. 2015; citado sep. 2015] Agave; Disponible en: http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/agave

3.5.1 *Agave marmorata*

El *Agave marmorata* se reconoce por las rosetas laxas con hojas verde-amarillentas o glaucas, ásperas al tacto, margen mamilado, espinas cortas y robustas, inflorescencia paniculada muy laxa y flores pequeñas de color amarillo brillante.

Distribución. Endémica de México, se conoce de los estados de Oaxaca y Puebla.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y zona de transición entre estas dos comunidades y el bosque de *Quercus*, suelos calizos o ígneos. En elevaciones de 680-1800 m.

Fenología. Florece en marzo y abril. Fructifica de mayo a julio.

Nombres comunes. “tepeztate”, “maguey curandero”, “pitzometl”, “pichometl”, “huiscole”, “jarabe pichomel”.

Usos. Elaboración de mezcal, aguamiel, pulque, propiedades curativas para la tos, úlceras, coágulos, asma, golpes y heridas, las flores son ornamento. Su uso medicinal ha sido restringido a la llamada “Pichomela” o curandera, y de ahí el nombre “pitzometl” o agave curandero.²⁵



Imagen 9. Agave pitzometl, estado de Puebla.

3.5.2 Metabolitos con actividad anticancerígena del genero *Agave spp*

Aglicona	Saponina	Línea celular	IC50	Especie
Tigogenina	Tigogenina 3-O-[α -L-rha (1 \rightarrow 4)- β -D-glu-(1 \rightarrow 3)- β -D-glu-(1 \rightarrow 3)- β -D-glu-(1 α 2)]- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal	HeLa	4.8 μ g/mL	A. <i>fourcroydes</i>
	Agamenosida G / Tigogenina-3-O- α -L-rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-glu(1 \rightarrow 2)-[β -D-glu(1 \rightarrow 3)]- β -D-glu(1 \rightarrow 4)- β -D-gal)	HepG2	6.9 μ g/mL	A. <i>americana</i>
Honguangenina	Cantalasaponina 1 / 3,6-di-O-[β -D-glu]-(25R)-5 α -espirostan-3 β ,6 α ,23 α -triol	BT-549	10 μ g/mL	A. <i>americana</i>
		JTC-26	Not specific	A. <i>cantala</i>
Esmilagenina [(25R)-5 β -espirostan-3 β -yl O- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal	(25R)-5 β -espirostan-3 β -yl O- β -D-glu-(1 \rightarrow 3)- β -D-gal	HL-60	4.9 μ g/mL	A. <i>utahensis</i>
			7 μ g/mL	
			4.9 μ g/mL	
Gitogenina [(25R)-2 α -hidroxi-5 α -espirostan-3 β -yl O- β -D-glu-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal.	(25R)-2 α -hidroxi-5 α -espirostan-3 β -yl O- β -D-glu-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glu-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal	HL-60	12.3 μ g/mL	A. <i>utahensis</i>
			5.5 μ g/mL	
			11.3 μ g/mL	
Clorogenina	Clorogenina 3-O-[α -L-rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-glu-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glu-(1 \rightarrow 3)- β -D-glu-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal]	HeLa	13.1 μ g/mL	A. <i>fourcroydes</i>
Hecogenina	3-O-[α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-glu-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glu-(1 \rightarrow 3)- β -D-glu-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal]	HeLa	5.2 μ g/mL	A. <i>sisalana</i>
	Hecogenina 3-O- β -D-glu-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glu-(1 \rightarrow 4)- β -D-gal	NCI- MCF-7	4.0 \pm 2.2 5.3 \pm 1.8	

Cuadro 2. Saponinas aisladas de *Agave spp.* y sus efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares. Cuadro tomado de: Santos L, Leal A, Cortés E, Gutiérrez J. *Agave (Agave spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. Curr Bioact Compd. 2016;8.*

3.6 Cáncer.

El cáncer es una enfermedad genética caracterizada por el crecimiento y diseminación de células anormales en el cuerpo. Es causado por la acumulación de mutaciones en la secuencia de nucleótidos del ADN, esto por factores hereditarios o ambientales tal como carcinógenos, radiación o virus. Estos cambios genéticos alteran la proliferación, muerte y envejecimiento de las células, confiriéndoles a las células ventajas en la proliferación y supervivencia lo que genera una multiplicación descontrolada e invasión a tejido circundante o distante (metástasis).²⁶

Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Sin embargo este proceso puede acumular errores a lo largo de los años, ocasionando cambios en la secuencia de nucleótidos y en cierto punto activar genes protooncogénicos e inactivar genes supresores de tumores por la acumulación de estas mutaciones. Esta inestabilidad genética interfiere en la replicación del genoma y en consecuencia, aumentan el número de mutaciones, también disminuye la eficacia de reparación del ADN y aumentan los cortes y reordenamientos cromosómicos produciendo un cariotipo anormal.²⁶

Estas mutaciones le confieren a la célula una ventaja competitiva aumentando la proliferación y supervivencia de manera nociva para el organismo afectando la población de células corporales alterando su estructura y función normal.²⁶

Los tumores cancerosos inician con anomalías mínimas en la morfología celular (displasia) como resultado de mutaciones que evolucionan con lentitud. La división y proliferación de estas células anormales crea tejido nuevo anormal al que se le conoce como neoplasia, en esta población se producen mutaciones nuevas mientras aumenta el grado de la neoplasia hasta transformarse en cáncer al conferirle la propiedad de invadir el tejido circundante y propagarse a otros lugares del cuerpo (metástasis).²⁷

Al contrario de los tumores malignos, los tumores benignos no se extienden a los tejidos cercanos, no los invaden y al extirparse, generalmente no vuelven a proliferar. Sin embargo, a veces pueden ser bastante grandes.²⁷

3.7.1 Características de las células cancerosas

1. No dependen de señales extracelulares para crecer, sobrevivir y dividirse. Con frecuencia se debe a mutaciones en las vías de señalización celular, por ejemplo el gen *ras* puede producir una señal intracelular de proliferación en ausencia de señales extracelulares.
2. Evaden la apoptosis. Esta situación suele deberse a mutaciones en genes que regulan esta vía, el 50% de los pacientes con cáncer presentan mutación en el gen *p53* que actúa como mecanismo de control determinando así si la célula muere por apoptosis por daños en el ADN.
3. Proliferan de manera ilimitada, esto se logra por la reactivación de la enzima telomerasa que mantienen la longitud del telómero en los extremos de sus cromosomas.
4. Son genéticamente inestables, su tasa de mutación es alta.
5. Carecen de moléculas de adhesión como caderinas que hace posible su diseminación.
6. Pueden sobrevivir y proliferar en diferentes tejidos de su lugar de origen.²

3.7.2 Estadísticas de mortalidad del cáncer

Los principales tipos de cáncer a nivel mundial son los siguientes:

- Pulmonar (1,59 millones de defunciones);
- Hepático (745 000 defunciones);
- Gástrico (723 000 defunciones);
- Colon-rectal (694 000 defunciones);
- Mamario (521 000 defunciones);
- Esófago (400 000 defunciones).
- Cervicouterino (270 000 defunciones).

Más del 70 % de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030.²

3.7.3 Muerte celular

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada. El número de células de esta comunidad está regulado con precisión, no solo controlando la velocidad de la división celular, sino también regulando el ritmo de la muerte celular, aquellas células que ya no son necesarias se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte. En condiciones fisiológicas las células dañadas o senescentes están sujetas a recambio y se eliminan principalmente por una vía de muerte activa y controlada denominada apoptosis. Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular y cuando se altera, se desarrollan enfermedades degenerativas como Alzheimer, Huntington, desórdenes autoinmunes y cáncer.²⁸

Por otro lado existe otro tipo de muerte celular que responde a una lesión aguda donde suelen hincharse y romper la membrana plasmática, dicho proceso es considerado como necrosis celular la cual es un tipo de muerte que da lugar a una respuesta inflamatoria potencialmente perjudicial.²⁸

3.7.31 Apoptosis

La apoptosis tiene una función importante en la prevención de la transformación maligna de las células ya que detiene la proliferación y elimina las células que sufrieron mutaciones. Esta puede iniciarse por estímulos internos, como anomalías en el ADN (vía intrínseca), y externos como por citocinas (vía extrínseca).²⁹

En la vía extrínseca el estímulo lo porta una proteína mensajera extracelular que se forma en células del sistema inmunitario como respuesta a factores adversos que dañan las células. El ligando se une a un receptor transmembranal de la familia de “receptores de muerte”. Su unión produce un cambio conformacional

que conduce al reclutamiento de proteínas citoplasmáticas (TRADD, FADD y procaspasa 8). Los dominios citoplasmáticos del receptor y estas proteínas interactúan formando un complejo que activa a la procaspasa 8 en caspasa 8 iniciadora, ésta divide a otras procaspasas para formar caspasas ejecutoras lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan.³⁰

Los estímulos internos como el daño genético irreparable, concentraciones elevadas de Ca^{2+} , infección viral, estrés oxidativo y la ausencia de señales de supervivencia desencadenan la apoptosis intrínseca. Esta vía está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. En una célula saludable, las proteínas proapoptóticas están ausentes o inhibidas por las proteínas antiapoptóticas. En presencia de cierto tipo de estrés se activan las proteínas BH3 y ciertos integrantes de la familia Bcl-2, como Bax, quedan libres para trasladarse del citosol a la membrana mitocondrial externa en donde se integran aumentando la permeabilidad y fomentando la liberación de citocromo c.³⁰

Una vez liberado el citocromo c no hay retorno de la apoptosis. Se forma un complejo multiproteico llamado apoptosoma, que incluye varias moléculas de procaspasa 9. Estas procaspasas se activan con la unión al complejo a caspasas 9 iniciadoras, que activan las proteínas ejecutoras culminando en la activación de la procaspasa 3 que activa endonucleasas que fragmentan el ADN, lo cual causa la apoptosis.³⁰ En la figura 14 (a) se muestran los cambios morfológicos de la célula ocurridos durante la apoptosis.

3.7.3.2 Necrosis

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria.²⁹ Como se muestra en la figura 14 (b).

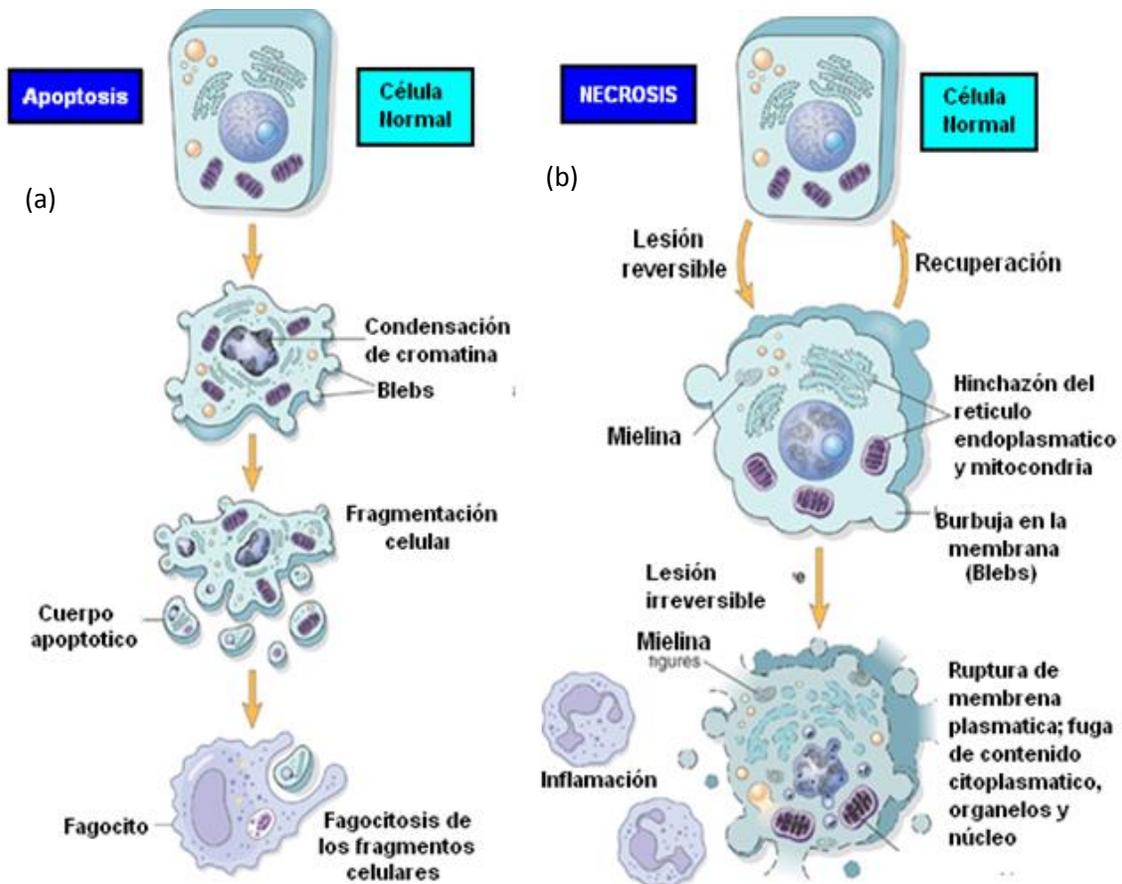


Imagen 14. Fases de muerte celular por apoptosis (a) y necrosis (b). Imagen tomada de Curso de Patología [Internet]. 2014 [Citado mar 2016] Diferencias Morfológicas entre Necrosis y Apoptosis; Disponible en: <http://patologiabcom6.blogspot.mx/2014/05/blog-post.html>

3.7.4 Cultivo celular.

“Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', con sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen cuatro tipos de cultivo celular:

- Cultivo de órganos
- Explantes primarios
- Cultivo celular primario.
- Subcultivos y líneas celulares

Los cultivos sucesivos de un cultivo celular primario se denominan líneas celulares y su formación implica:

- Aumento en el número de células obtenidas.
- Población celular uniforme y homogénea.
- Características conservadas durante las sucesivas generaciones.
- Conservación indefinida en nitrógeno líquido.

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar y mueren. Sin embargo, las células cancerígenas evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente y se caracterizan por lo siguiente:

- Son inmortales, crecen indefinidamente.
- Se pierde la inhibición por contacto, la limitación de la densidad celular durante la proliferación y la dependencia del anclaje.
- Son malignas, invaden tejidos y dan lugar al crecimiento de tumores.
- Varía el número y morfología cromosómica.

En 1952 se obtuvo la primera línea celular continua humana. Son las denominadas células HeLa, células extraídas a partir de un tumor de cuello de una paciente afroamericana que se llamaba Henrietta Lacks.”³¹

Aplicaciones del cultivo celular en cáncer.

Una de las aplicaciones de los cultivos celulares es determinar las interacciones que existen entre determinado tipo de células y un compuesto o sustancia de interés. Para esto se ocupan diferentes técnicas o métodos que miden la proliferación o muerte celular tras determinado tratamiento. Cabe mencionar que los tratamientos requieren un vehículo inerte con las células para facilitar la incorporación de los elementos a evaluar en el medio de cultivo y con ello la

interacción con la célula. Algunas técnicas para medir proliferación celular y citotoxicidad son las siguientes:

- *Proliferación celular por incorporación de cristal violeta*

Es una técnica colorimétrica basada en la permeabilidad de membranas celulares viables al cristal violeta, permite determinar el número o cantidad celular. La cuantificación se realiza espectrofotométricamente por la absorción del cristal violeta extraído con ácido acético de las células permeables a 600 nm.

- *Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH*

La técnica de citotoxicidad mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular, capaz de reducir una sal de tetrazolio (yodonitrotetrazolio INT) a una sal de formazan roja. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas y a la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Existen estuches de ensayo citotóxico con los reactivos necesarios para la actividad enzimática y el sustrato a reducir como Kit CytoTox 96®

3.7.5 Cáncer Cervicouterino (CaCu)

El cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más frecuente y tiene la cuarta tasa de mortalidad en las mujeres.³ La mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino se puede prevenir con exámenes de detección de rutina y con el tratamiento de las lesiones precancerosas.⁴

Los factores de riesgo involucrados son: inicio a edad temprana de relaciones sexuales, haber tenido varias parejas sexuales y el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos, así como una detección tardía, son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión del CaCu.³²

Los eventos tisulares que se presentan en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con una

displasia que origina una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión intraepitelial de bajo grado. La NIC-II junto con la NIC-III, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado, estas lesiones a nivel celular se muestran en la imagen 15. Presentándose de esta manera un cáncer in situ. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico.³²

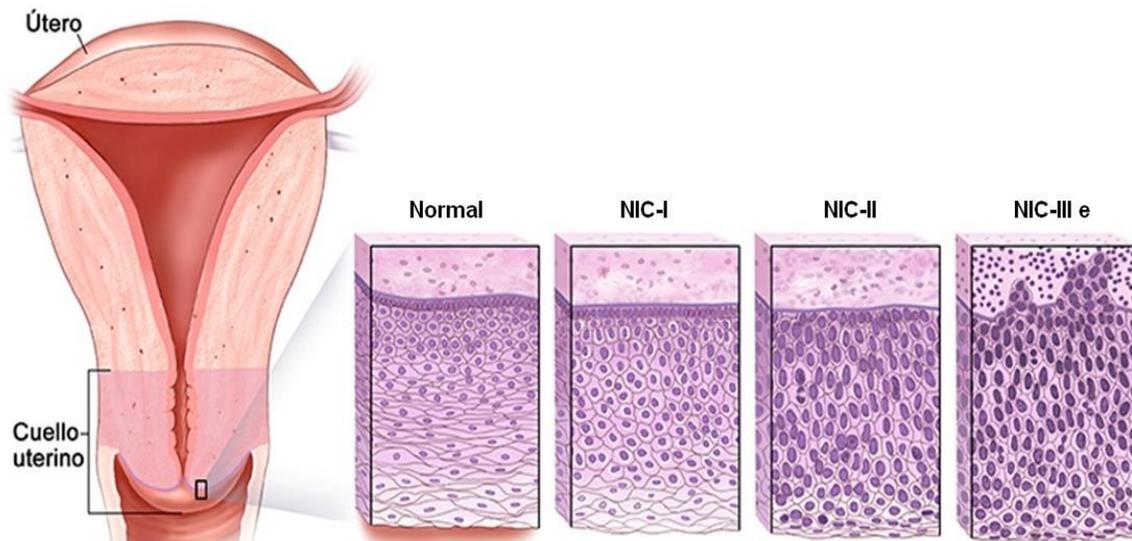


Imagen 15. Células del Cérvix que muestran las diferentes neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC). Imagen tomada de 33. Displasia [Internet] España; 2014 [actualizado nov. 2014; citado mar 2016] Displasia Cervical; Disponible en: <http://www.displasia.es/displasia-de-cadera/displasia-cervical/>.

3.7.6 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Dentro de los diferentes factores que aumentan el riesgo de contraer CaCu, destaca la infección del virus del papiloma humano (VPH) asociado en un 97.9% de los casos con la infección.²

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus de ADN circular de cadena doble con cerca de 7 900 pares de bases, encerrados en una cápside proteica icosaédrica de 72 lados. Los virus del papiloma humano constituyen un grupo divergente de virus con relaciones evolutivas y características similares pero

enormes diferencias en especificidad de especie, sitio de predilección y potencial oncogénico. Las secuencias de más de 70 tipos de VPH ya están identificadas.³⁴

En particular los tipo 16 y 18 se encuentran en el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cervicouterino es negativo a VPH. Por lo tanto, la progresión de la infección del VPH o la falta de tratamiento es causa suficiente para el desarrollo de cáncer.³⁴

La infección por VPH se presenta a través de micro-heridas en el epitelio que exponen células de la lámina basal a la infección viral. Las células de la lámina basal son células que están en constante división y proveen un reservorio de células para la región suprabasal. La infección viral activa la maquinaria celular para producir de 20 a 100 copias extracromosomales del ADN viral por célula, promoviendo la división celular de las células infectadas con lo que se afecta el ciclo celular y estas células proliferan.³⁵

3.7.7 Tratamiento de CaCu

Las opciones de tratamiento para el cáncer del cuello uterino dependen principalmente de la etapa del cáncer. Los tres tipos principales de tratamiento contra el cáncer de cuello uterino son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Algunas veces el mejor plan de tratamiento incluye dos de estos métodos o más. Si no es posible lograr una curación, la meta es extirpar o destruir la mayor parte posible del cáncer para evitar que el tumor crezca o se propague.³⁶

Cirugía

Existen varios tipos de cirugía contra el cáncer del cuello uterino. En algunas se hace la extirpación del útero (histerectomía), mientras que en otros no. Si el cáncer se ha propagado fuera del útero, puede que sea necesario extirpar otros órganos, tales como el colon.³⁷

- Criocirugía: Este método se utiliza para tratar el cáncer pre-invasor del cuello uterino, pero no para el cáncer invasor. Las células cancerosas se destruyen mediante la congelación.
- Cirugía por láser: Se emplea un rayo láser para quemar las células o para extraer una muestra pequeña de tejido para estudiarlo. La cirugía por láser se usa sólo como tratamiento contra el cáncer pre-invasor del cuello uterino.
- Histerectomía: El útero se extirpa a través de una incisión en la parte delantera del abdomen o a través de la vagina. Después de esta operación, una mujer no puede quedar embarazada.³⁷ Como se ilustra en la imagen 17.

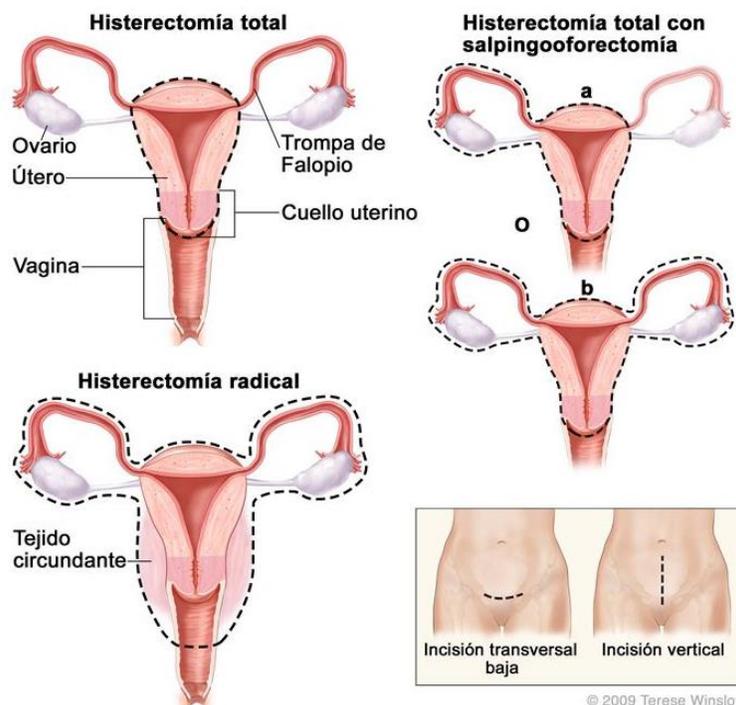


Imagen 17. Tipos de histerectomía como tratamiento para el CaCu. Imagen tomada de: Instituto Nacional del Cáncer [Internet] Arizona. Lowy D. [actualizado abr. 2014; citado sep. 2015] Cáncer de Cuello Uterino: Tratamiento [aproximadamente 10 pantallas]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/pro/tratamiento-cuello-uterino-pdq>

Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento que usa rayos de alta energía (rayos X) para eliminar o encoger las células del cáncer. La radiación puede provenir de fuera del cuerpo (radiación externa) o de materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (radiación interna o implante).³⁸

La radiación puede causar efectos secundarios. La mayoría de éstos desaparecen después de un corto período de tiempo. La piel en el área tratada puede parecer como quemada por el sol, y más tarde bronceada. La piel vuelve a la normalidad en un plazo de entre 6 y 12 meses. También pudiera presentar cansancio, malestar estomacal. El tratamiento en el área de la pelvis puede hacer que la vagina se vuelva más angosta, debido a la formación de tejido cicatricial. Esto puede producir dolor durante las relaciones sexuales. También puede presentarse una menopausia prematura y problemas para orinar. Las fracturas son otro efecto secundario de la radiación administrada a la pelvis (tumores próstata, recto y CaCu). La mayoría de éstas son fracturas de la cadera producidas por osteolisis o necrosis avascular (perdida de vascularización del hueso) que debilitan el tejido óseo.³⁹

Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células del cáncer. Usualmente los medicamentos se administran por vía intravenosa u oral. Una vez que los medicamentos entran en el torrente sanguíneo, llegan a todo el cuerpo. A veces, se administran varios medicamentos al mismo tiempo.⁴⁰

La quimioterapia ocasiona diversos efectos secundarios dependiendo del tipo de medicamento, la cantidad administrada y la duración del tratamiento. Los efectos secundarios podrían incluir los siguientes:

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

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

La mayoría de los efectos secundarios de la quimioterapia (excepto la menopausia y la infertilidad) desaparecen una vez que se termina el tratamiento.⁴⁰

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que el cáncer cervicouterino ocupa la cuarta tasa de mortalidad y el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres, la detección temprana y la inmunización contra el VPH han disminuido su incidencia y mortalidad con lo que se espera esta tendencia continúe. Sin embargo una vez detectado, solo existen tres principales tipos de tratamiento: quimioterapia, radioterapia y cirugía.

Los tratamientos contra el cáncer como son la quimioterapia y radioterapia, se basan en el ciclo celular de dichas células, alterando principalmente su ADN y llevándolas a la muerte. Sin embargo, distintos tipos de células también se encuentran en división continua como son las células de la médula ósea, epitelios, fibras musculares, células del cabello, piel, uñas y entre otras. Por lo cual estos tratamientos provocan diversos efectos secundarios afectando así la calidad de vida del paciente.

Por esta razón en la actualidad se buscan compuestos de que sean específicos en la actividad antitumoral como una alternativa a los tratamientos tradicionales.

Estudios recientes¹ han demostrado que el extracto crudo de agave pitzometl presenta un efecto antiproliferativo sobre células de cáncer cervicouterino HeLa con una IC₅₀ de 380 µg/mL en una relación dosis dependiente a 24 h de tratamiento. Además tiene un bajo efecto citotóxico por la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (5.17 %), induce a las células HeLa a presentar características morfológicas de células apoptóticas y tiene un bajo potencial antiproliferativo en linfocitos humanos de un 10.60 % sin inducir necrosis en 72 h de tratamiento.

Por lo anterior es importante continuar con el análisis fitoquímico del extracto, probar su actividad en diferentes líneas celulares e identificar la fracción con dicha actividad para aislar el o los principios activos.

5 OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad antiproliferativa de los diferentes extractos de agave pitzometl en células CaSki de cáncer cervicouterino.

Objetivos particulares

- Purificar los disolventes a utilizar para evitar contaminación en el extracto y en la separación del mismo.
- Obtener el extracto crudo de la hoja del agave pitzometl por trituración, filtración y evaporación a presión reducida del zumo obtenido.
- Separar el extracto crudo de agave pitzometl mediante extracciones seriadas con diferentes disolventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol, agua),
- Concentrar los extractos separados por destilación a presión reducida para evitar la descomposición térmica de sus componentes.
- Analizar por cromatografía en capa fina cada uno de los extractos, para detectar cualitativamente la separación del extracto crudo en base a su polaridad.
- Evaluar el potencial antiproliferativo y efecto citotóxico de cada uno de los extractos en células CaSki de cáncer cervicouterino.

6 HIPÓTESIS

Si el extracto crudo de agave pitzometl presenta actividad antiproliferativa sobre células HeLa, se espera que la actividad se mantenga para células CaSki y en separación de sus componentes en seis extractos de diferente polaridad, se detecte un mayor efecto en aquellos en donde se encuentren concentradas las moléculas responsables y descartar aquellos que no tengan la actividad o sea menor.

7 DISEÑO EXPERIMENTAL

- Tipo de estudio: Experimental
- Variable independiente: Extractos
- Variable dependiente: Actividad antiproliferativa

Población de estudio.

- Extractos de diferente polaridad del agave pitzometl.
- Cultivos de células CaSki ,

Criterios de inclusión:

- Extractos que puedan solubilizarse en el medio de cultivo
- Cultivos frescos no saturados.

Criterios de Exclusión:

- Extractos que no presenten actividad antiproliferativa
- Cultivos celulares con morfología atípica.

Criterios de eliminación

- Extractos quemados o descompuestos.
- Placas con presencia de cristales insolubles en el medio de cultivo.
- Pérdida o contaminación de la placa.

Técnicas

- Extracción
- Destilación
- Cromatografía en capa fina
- Cultivo celular
- Proliferación celular por incorporación de cristal violeta
- Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH

8 REACTIVOS MATERIAL Y EQUIPO

Reactivos	Marca
Agave Pitzometl	
Hexano	Conquimex
Diclorometano	Conquimex
Acetato de etilo	Conquimex
Acetona	Conquimex
Etanol	Conquimex
Agua bidestilada	
Sulfóxido de dimetilo (DMSO)	Conquimex
Metanol	Conquimex
Revelador (Rev.) Dragendorff	Sigma Aldrich
Rev. KOH 10% etanol	Sigma Aldrich
Rev. vainillina- ácido sulfúrico	Sigma Aldrich
Rev. de acetato de plomo	Sigma Aldrich
Medio de cultivo RPMI-1640	Sigma Chemical Co. USA
Buffer de fosfatos (PBS)	Sigma Chemical Co. USA
Verseno	Sigma Chemical Co. USA
Glutaraldehido 1.1%	Sigma Aldrich USA
Cristal violeta 0.1%	Sigma Aldrich USA
Ácido acético 10%	Sigma Aldrich USA

Material	Marca
Parrilla de agitación	Corning y Thermolyne
Canastilla de calentamiento	
Matraz bola de 5000 MI	Pyrex USA
Matraz bola de 1000 MI	Pyrex USA
Matraz bola de 500mL	Pyrex USA
Matraz bola de 250MI	Pyrex USA
Cabeza de destilación 14/23	Pyrex USA
Cola de destilación 14/23	Pyrex USA
Refrigerante 14/23	Pyrex USA
Termómetro -10° a 150°C	Pyrex USA
Agitador magnético	
Matraz Kitasato 1 L	Pyrex USA
Embudo büchner	Pyrex USA
Papel filtro	
Embudo de separación 2000 mL	Pyrex USA
Pinzas de tres dedos	
Soporte universal	
Embudo de tallo corto	Pyrex USA
Cromatoplacas	
Tubos capilares	Pyrex USA
Cámara de elución	
Placa de 96 pozos	Corning USA
Tubos cónicos de 1.5 mL	Eppendorf
Gradilla	
Papel parafilm	
Portaobjetos	
Cámara de Neubauer	Clay Adams USA
Tubos con tapón de rosca	

INSTRUMENTOS	MARCA
Micropipetas (10,100, 200,1000, 5000 µL) Micropipeta multicanal 200 µL Probeta 150 mL Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL	Gilson Labnet International Pyrex USA Pyrex USA

Equipo	Marca
Bomba de vacio Centrifuga Autoclave Incubadora Lámpara UV Microscopio Balanza analítica Estufa Refrigerador Lector de placas ELISA	Fellsa HermLe Z200A IMMSA Nuaire us Autoflow UVP an Analytik Jena Company AusJENA SEDIVAL SCIENTECH Thermo scientific Daewoo SofMaxPro USA

9. METODOLOGÍA

Purificación de disolventes

Los disolventes se purificaron de acuerdo a las técnicas indicadas en la literatura.⁴¹

- Hexano.
- Diclorometano
- Acetato de Etilo
- Acetona
- Etanol
- Agua

Después del tratamiento se realizaron destilaciones a todos los disolventes y se colectaron en un frasco bien cerrado y etiquetado.

Obtención del extracto.

Se retiró la corteza de la hoja de agave, se cortó en pequeños trozos y se pesaron 1.8 kg de este. Posteriormente se colocaron en un extractor de jugos y se recolectaron 347 mL de líquido. El extracto líquido resultante se llevó a sequedad por destilación a presión reducida y se pesaron 10.82 g de residuo sólido el cual se conservó en refrigeración a 4 °C.

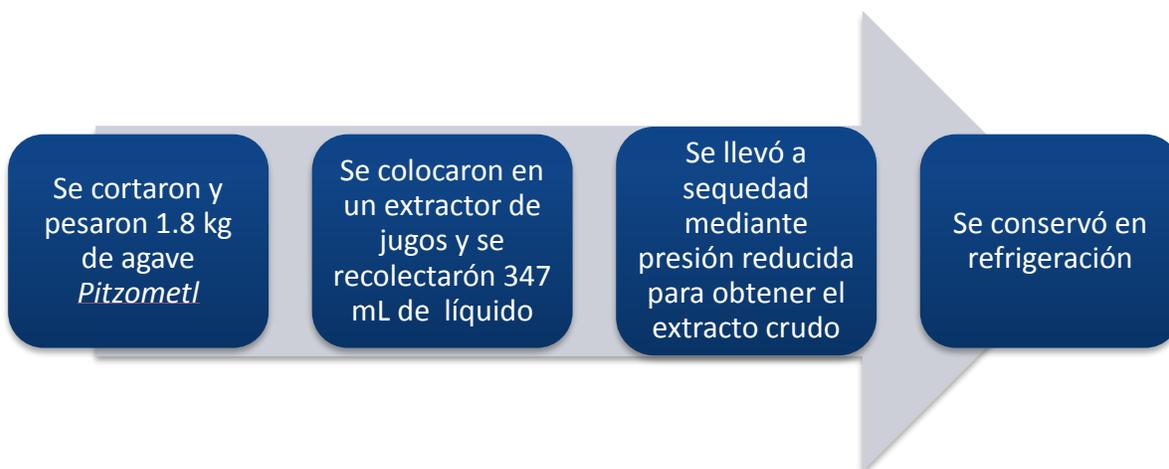


Diagrama de flujo 1. Obtención del extracto crudo

Separación de extractos.

Se colocaron en agitación 8 g del extracto obtenido con un litro del hexano durante 48 h. Posteriormente se filtró y el sólido resultante se sometió a agitación con el siguiente disolvente en orden de polaridad ascendente, mientras que el filtrado se llevó a sequedad en el rotavapor. Este proceso se repitió con cada uno de los disolventes obteniendo seis extractos en polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua.



Diagrama de flujo 2. Separación del extracto

Cromatografía en capa delgada.

Una porción del extracto obtenido se evaluó por cromatografía en capa delgada para detectar la elución diferencial de cada extracto revelada por vapores de yodo

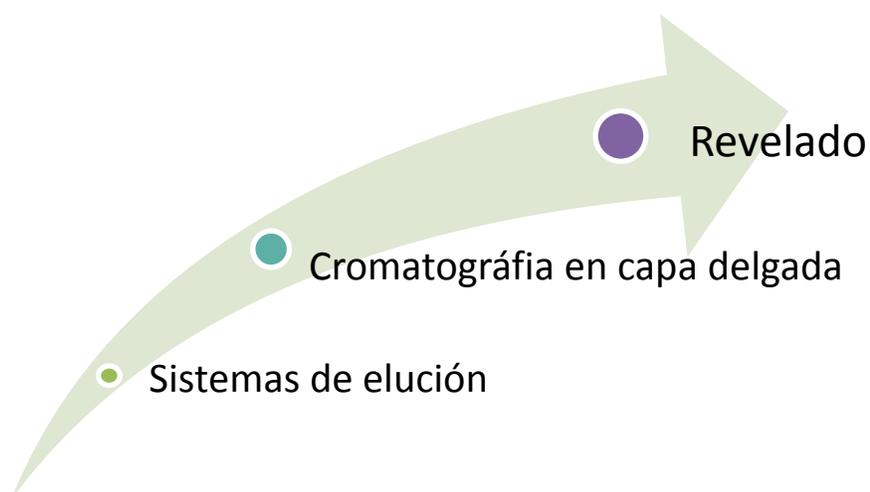


Diagrama de flujo 3. Cromatografía en capa delgada

Cultivo de células tumorales

Las células provenientes de cáncer cervicouterino CaSki se sembraron en cajas petri de cristal con 10 mL de de medio celular RPMI-1640 suplementado con L-glutamina bencilpenicilina, rojo de fenol y 5 % de suero de neonato de cabra (CNS) desactivado a 56 °C por 30 min.

Los cultivos fueron incubados a 37 °C al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación.

Para la realización de los ensayos, los cultivos se desarrollarán hasta 60 o 70 % de saturación de la caja para posteriormente ser utilizados.

Determinación de la proliferación celular

Antes de realizar los tratamientos, los extractos tuvieron que ser solubilizados y sonicados en la mínima cantidad de disolventes no tóxicos para los cultivos celulares utilizando mezclas entre DMSO, agua, etanol y acetato de etilo. A estos disolventes se les llamó vehículo y su efecto también se determinó en los cultivos celulares.

En una caja de cultivo de 96 pozos se sembraron 7500 células CaSki por pozo con 100 µL de medio RPMI y se cultivaron por 24 h.

Se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 µL de las disoluciones de los diferentes extractos del agave pitzometl, en concentraciones de 600, 300, 150, 75, 37.50, 18.75 µg/mL y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se retiró el medio de cultivo y la placa se secó al aire. Posteriormente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % por 15 min.

Se retiró el glutaraldehído secando la placa al aire y las células se tiñeron con cristal violeta al 0.1 % por 20 min con agitación constante.

El cristal violeta se retiró y se lavó con agua destilada hasta que no exista exceso de colorante.

La placa se dejó secar al aire y se agregaron 50 μ L de ácido acético al 10 % por 20 min con agitación constante.

Posteriormente se determinó la absorbancia a 600 nm y se compararon con los grupos control.

Determinación de la IC₅₀ matemática

La IC₅₀ es aquella concentración que provoca un decremento en la población celular del 50%. Para su determinación las absorbancias obtenidas se representaron en porcentaje celular, el control se consideró como el 100 % de proliferación y se relaciono con los porcentajes celulares obtenidos después del tratamiento con los diferentes extractos del agave pitzometl, obteniendo así una ecuación de la recta y por regresión lineal se obtuvo la concentración que representaba el 50 % de proliferación celular.

Ensayo de necrosis por la liberación de LDH

Se sembraron 7500 células por pozo en una caja de cultivo de 96 pozos con 100 μ L de medio RPMI y se cultivaron por 24 h.

Se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 μ L de la IC₅₀ obtenida, a los grupos control solo se les cambio el medio y se incubaron a 37°C por 24 h.

Una hora antes de cumplir las 24 h de tratamiento se lisó a las células del control positivo con 100 μ L de medio al 1 % de tritón.

La placa se centrifugo a 1400 rpm durante 5 min y transfirieron 40 μ L de cada pozo a una placa nueva y limpia.

Se añadieron 40 μ L de la mezcla de reacción del ensayo citotóxico (Kit CytoTox 96®) a cada pozo y se incubó durante 20 min protegido de la luz.

Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas ELISA y el porcentaje de citotoxicidad fue calculado convirtiendo las absorbancias obtenidas a porcentaje tomando como 100 % las células lisadas con tritón.



Diagrama de flujo 4. Ensayos en células tumorales

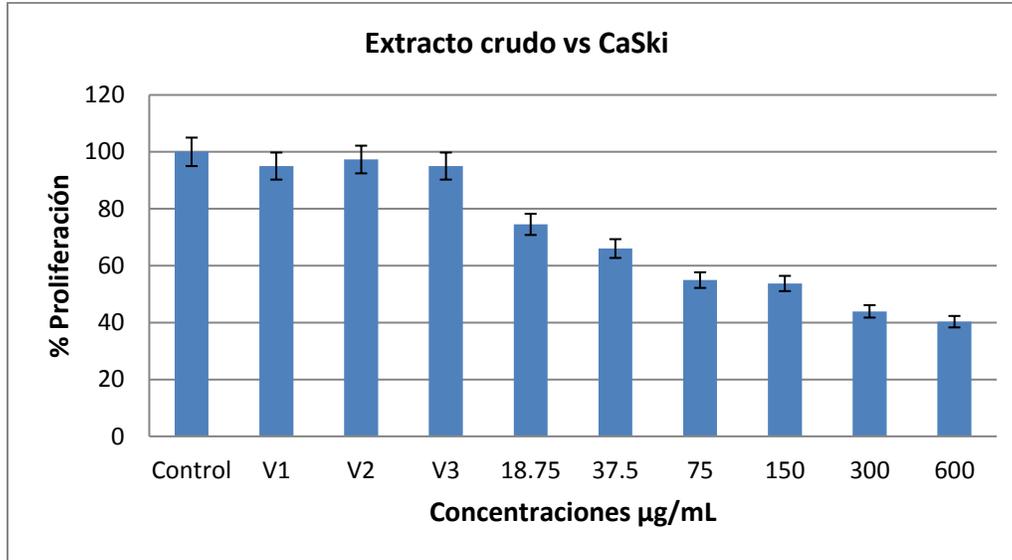
10.RESULTADOS

10.1 Cromatoplasmas comparativas de los extractos

Extractos	Sistema de elución	Revelador	Placa
1. Hexano 2. Crudo 3. Diclorometano	Hexano: Acetato de etilo 3:1	Yodo	1  2 3
1. Acetato de Et. 2. Crudo 3. Acetona	Hexano: Acetato de etilo 3:1	Yodo	1  2 3
1. Etanol 2. Crudo 3. Agua	Hexano: Acetato de etilo 3:1	Yodo	1  2 3

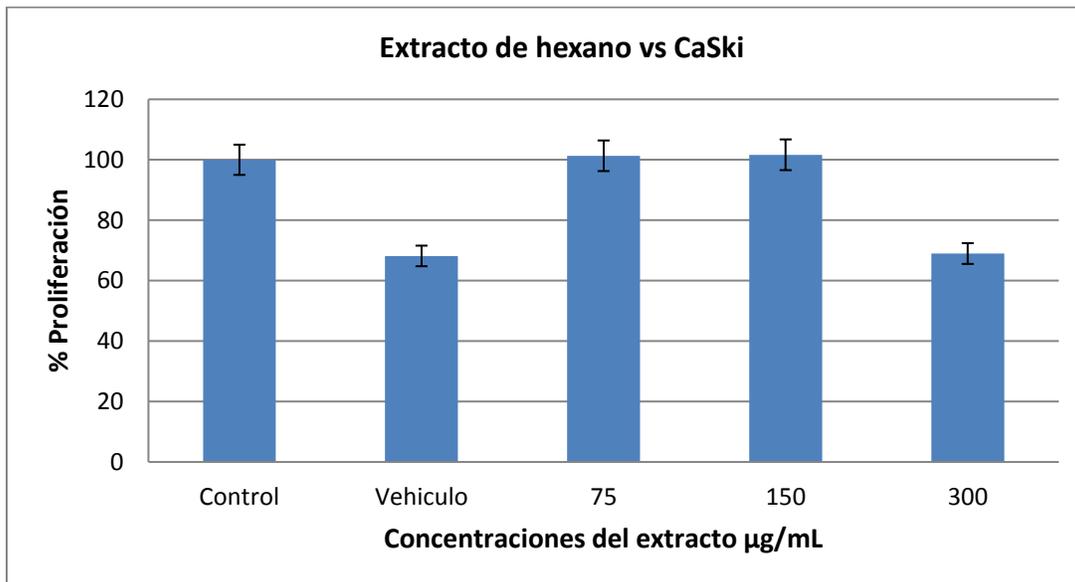
Cuadro 3. Comparación cromatográfica del extracto crudo con los diferentes extractos obtenidos, en donde se observa la elución del extracto crudo en la parte central y en los laterales la de los diferentes extractos de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua.

10.2. Graficas de proliferación celular tras el tratamiento con los diferentes extractos



Vehículo: Agua	V1= 600µL	V2 =300µL	V3 =150µL
----------------	-----------	-----------	-----------

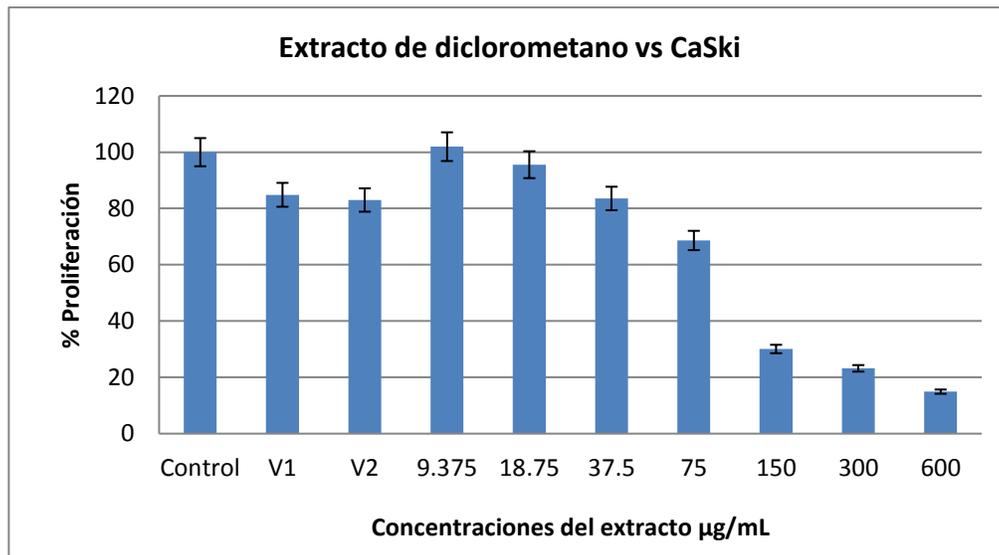
Gráfica1. Efecto antiproliferativo del extracto crudo de agave pitzometl sobre células CaSki tratadas con concentraciones crecientes del extracto por 24 h. Determinado por la técnica de cristal violeta



Vehículo: 36 µL DMSO/AcOEt/H ₂ O 10:1:1
--

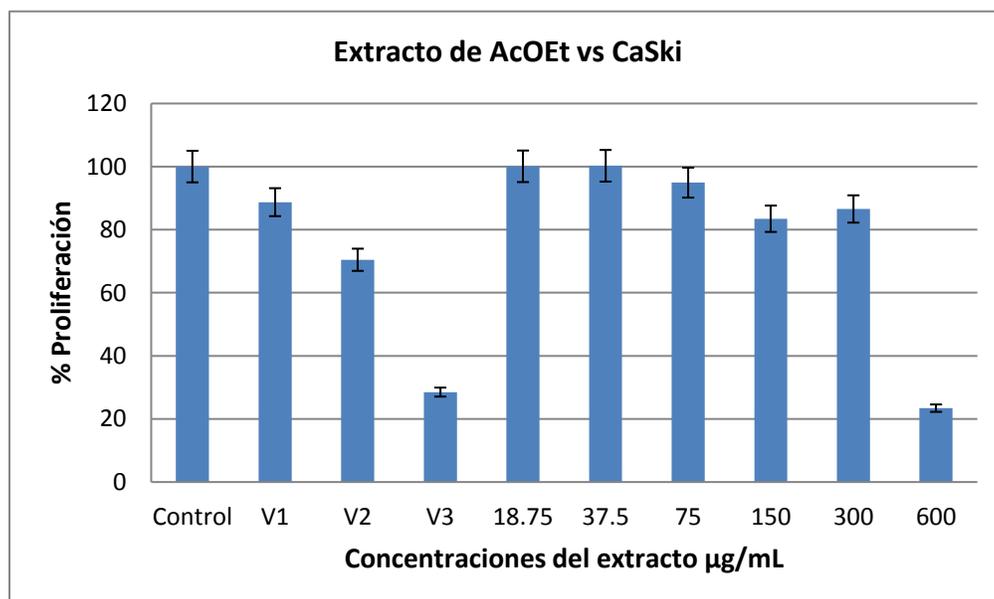
Gráfica 2. Porcentaje de proliferación de células CaSki tratadas con concentraciones crecientes del extracto de hexano observando que el decremento en la proliferación de la

concentración más alta se debe al vehículo utilizado por lo que el extracto no presenta efecto antiproliferativo.



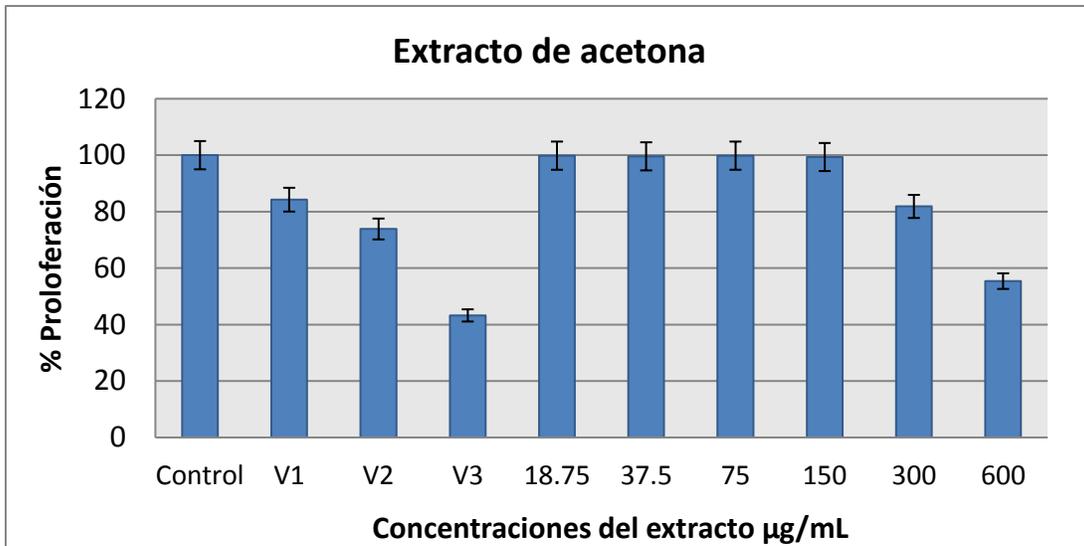
Vehículo: DMSO/Etanol 1:1	
V1 = 15 µL	V2 = 30 µL

Gráfica 3. Efecto antiproliferativo del extracto de diclorometano sobre células CaSki tratadas con concentraciones crecientes del extracto determinado por la técnica de cristal violeta en donde el mayor efecto es debido al extracto y no al vehículo.



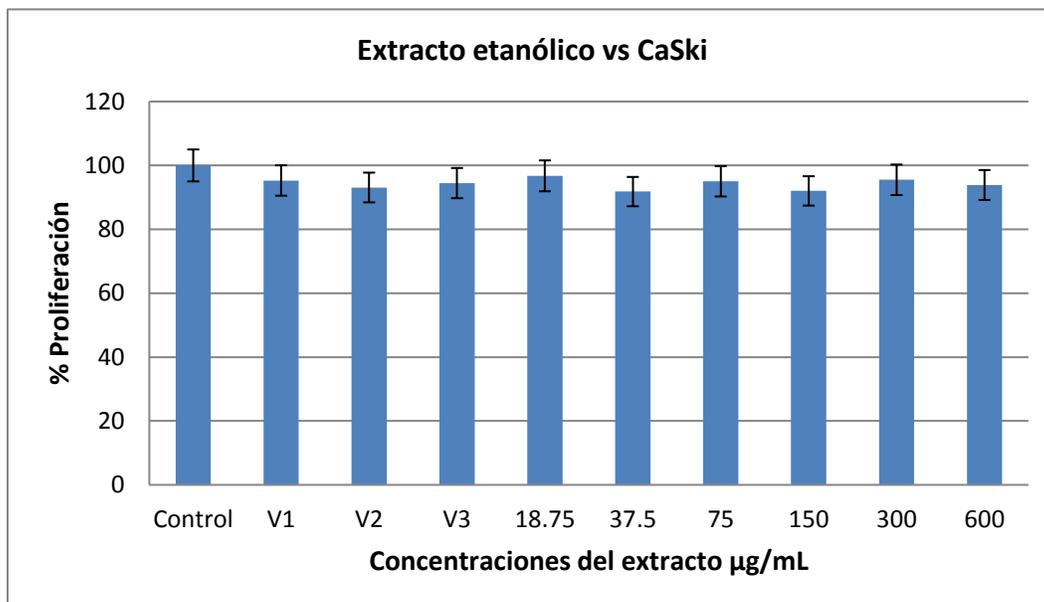
Vehículo: DMSO/Etanol 175:19		
V1 = 13µL para 200µg	V2 = 26µL para 400µg	V3 = 39µL para 600µg

Gráfica 4. Porcentaje de proliferación de células CaSki tratadas con concentraciones crecientes del extracto de acetato de etilo observando que el decremento en la proliferación es debido al vehículo utilizado correspondiente a las concentraciones mas altas por lo que el extracto no presenta efecto antiproliferativo.



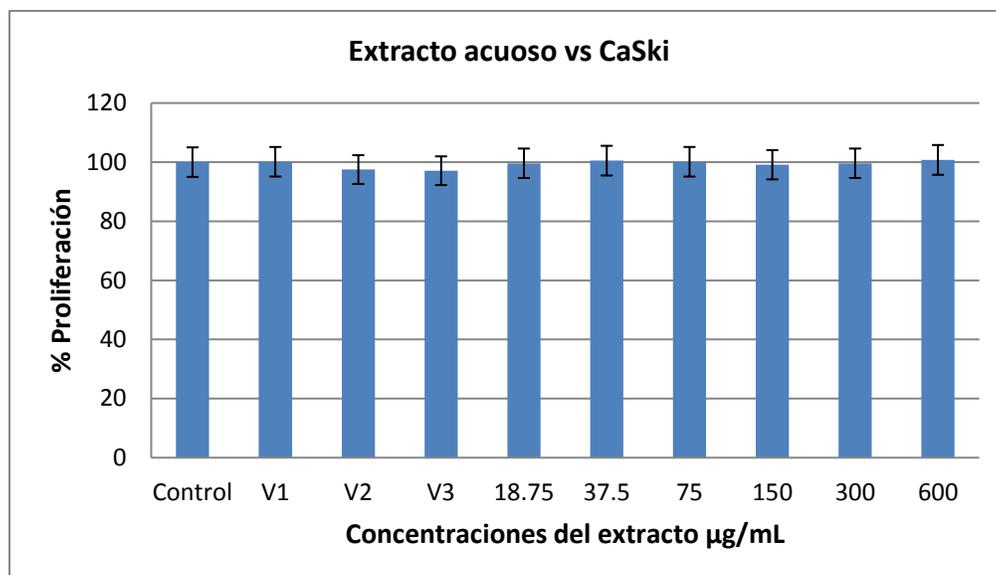
Vehículo: DMSO/Etanol 175:5		
V1=12µL para 200µg	V2 =24µL para 400µg	V3 =36µL para 600µg

Gráfica 5. Porcentaje de proliferación de células CaSki tratadas con concentraciones crecientes del extracto de acetona observando que el decremento en la proliferación es proporcional al efecto del vehículo utilizado por lo que el extracto no presenta efecto antiproliferativo.



Vehículo: Agua/Etanol/DMSO 10:2:1		
V1= 5.5µL para 150µg	V2 =11µL para 300µg	V3=22µL para 600µg

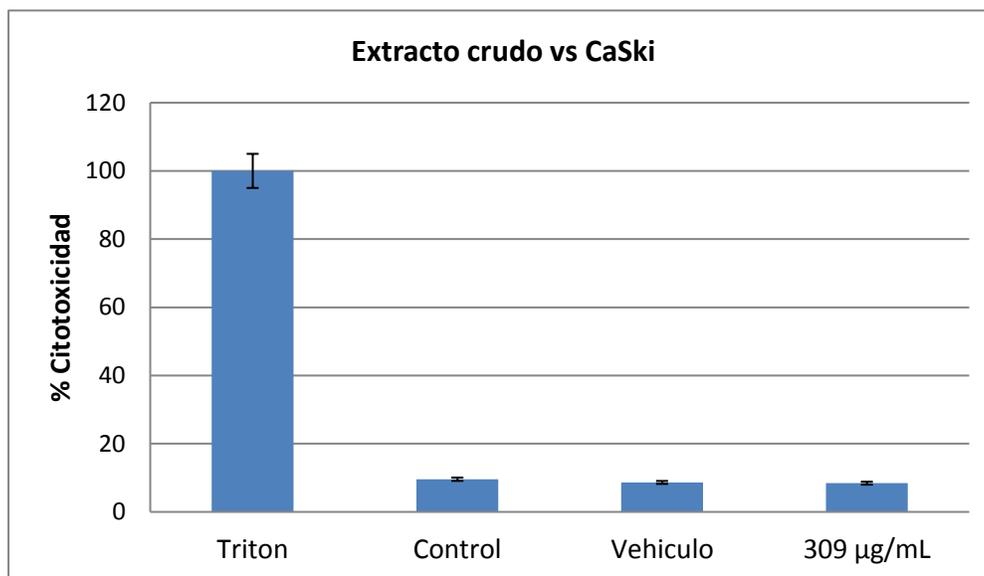
Gráfica 6. Porcentaje de proliferación celular CaSki tras el tratamiento con el extracto de etanol, en donde ni el tratamiento ni el vehículo utilizado tuvieron efecto en la proliferación por lo que el extracto no presenta efecto antiproliferativo.



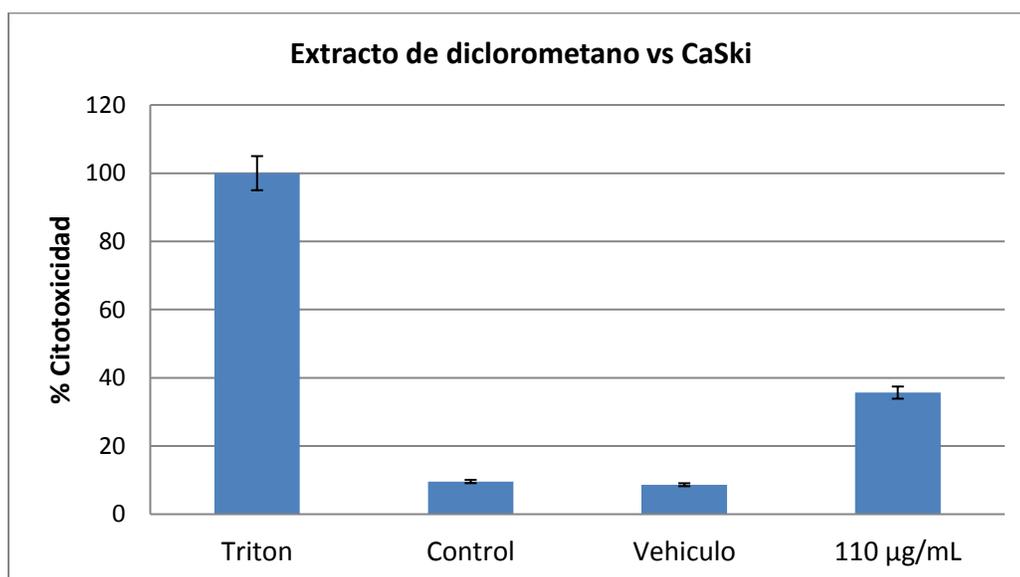
Vehículo: Agua		
V1 =150µL para 150µg	V2 =300µL para 300µg	V3= 600µL para 600µg

Gráfica 7. Porcentaje de proliferación celular CaSki tras el tratamiento con el extracto acuoso, en donde ni el tratamiento ni el vehículo utilizado tuvieron efecto en la proliferación por lo que el extracto no presenta efecto antiproliferativo.

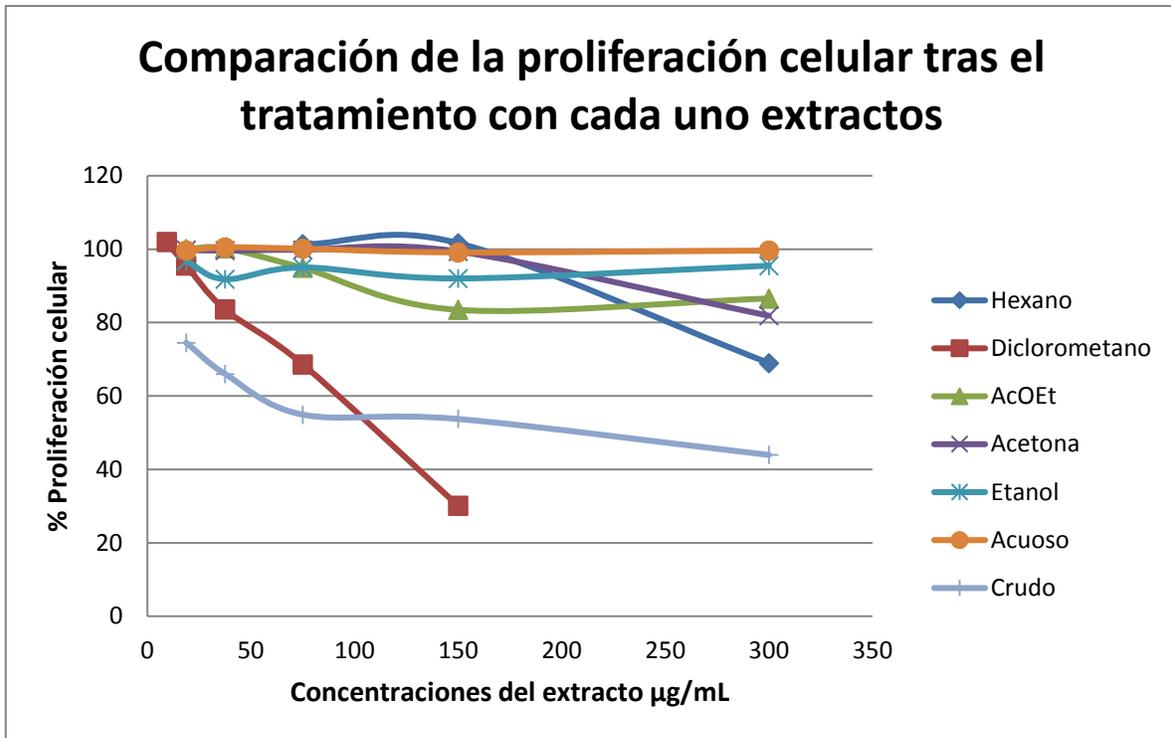
10.3. Graficas de efecto citotóxico de los extractos con actividad antiproliferativa.



Gráfica 8. Porcentaje de citotoxicidad del extracto crudo en células CaSki determinado mediante la cuantificación de la actividad de la enzima LDH por el Kit CytoTox 96®, observando una citotoxicidad menor a la del grupo control por lo que no existe daño a la membrana



Gráfica 9. Efecto citotóxico del extracto de diclorometano en células CaSki determinado mediante la cuantificación de la actividad de la enzima LDH por el Kit CytoTox 96®, observando una citotoxicidad del 35 % que indica una lisis celular debida al tratamiento con el extracto ya que el vehículo no fue necrótico.



Gráfica 10. Comparación del efecto antiproliferativo en células CaSki tratadas con concentraciones crecientes de los diferentes extractos obtenidos. Se puede observar un decremento en el extracto crudo y de diclorometano mientras que en el resto el efecto es nulo o debido al disolvente utilizado

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas son una fuente muy amplia de compuestos con actividades biológicas, sin embargo, contienen un gran número de compuestos responsables de diversas funciones en su metabolismo y la separación e identificación de estas moléculas presenta largos periodos de trabajo por lo que solo se ha estudiado un 5% de las plantas conocidas.⁶

Por lo anterior, la obtención del extracto crudo del agave pitzometl y su separación en seis extractos de diferente polaridad, representó una parte del análisis fitoquímico de este agave que da continuidad al trabajo previo que demostró la actividad antiproliferativa.¹

Como se observa en el cuadro 3, las cromatoplasmas comparativas de los extractos demuestran que estos presentan una composición diferente no solo por el número de manchas observadas, si no también por la distribución e intensidad de las mismas. Tras una elución con hexano:acetato de etilo 3:1 y un revelador de vapores de yodo se puede observar lo siguiente: La elución del extracto crudo, en la parte central de las cromatoplasmas, evidencia siempre dos componentes antes del frente del disolvente que son los más concentrados en la muestra; en el extracto de hexano los componentes aparecen hasta el frente del eluyente indicando una mayor afinidad por este y concentración de compuestos poco polares; el extracto de diclorometano muestra componentes concentrados cerca del punto de aplicación y algunos más afines por el eluyente; el extracto de acetato de etilo de igual manera muestra componentes cercanos al punto de aplicación y además aparece una elución parecida a la de uno de los componentes del extracto crudo, que sería la más cercana al frente del disolvente, esto al igual que en el extracto de acetona pero en menor proporción; para el caso del extracto de etanol y de agua, sus componentes no fueron eluidos por la mezcla

eluyente utilizada indicando que no había afinidad por la misma. Lo anterior evidencia una composición diferente en cada uno de los extractos obtenidos debida a la polaridad de las moléculas presentes.

En cuanto a la actividad antiproliferativa, del extracto crudo, se determinó que esta se mantiene en células CaSki sin efecto necrótico muy similar al efecto mostrado en células HeLa con una IC_{50} de $380\mu\text{g}/\text{mL}^1$. Esto como se observa en la gráfica 1 de la inhibición de la proliferación celular y en la gráfica 8 se demuestra el efecto no citotóxico del extracto en células CaSki.

En el caso de las gráficas 2, 4 y 5 correspondientes a la evaluación de los extractos de hexano, acetato de etilo y acetona respectivamente, se puede observar que el efecto encontrado se atribuye a los volúmenes de los vehículos utilizados y como tal no al tratamiento utilizado. Caso similar ocurrió en los extractos de etanol y agua como se observa en las gráficas 6 y 7 en donde las diferentes concentraciones evaluadas no presentaron efecto en la población celular. Ambos casos se interpretaron como la ausencia de actividad antiproliferativa, indicando que en estos extractos no se encuentran los componentes responsables de la actividad.

Por último, en el caso del extracto de diclorometano se observa una inhibición de la proliferación celular en concentraciones más bajas que las del extracto crudo con una relación dosis respuesta dependiente como se observa en la gráfica 3. Con lo cual se puede deducir que los componentes responsables de la actividad se encuentran en este extracto

Sin embargo, la actividad citotóxica de este extracto presenta efecto necrótico del 35.65 %, esto comparado con el grupo control según la cuantificación de la enzima LDH representada en la gráfica 9, lo cual indica una lisis celular por el daño a la membrana que puede deberse a diferentes compuestos presentes en el extracto. Por lo cual es necesario continuar el trabajo con la separación de los compuestos y determinar cual o cuales de estos presentan actividad antiproliferativa y no necrótica.

12. CONCLUSIONES

Se obtuvo el extracto crudo del agave pitzometl y se separó en seis extractos con disolventes de diferente polaridad, (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua).

Se determinó por cromatografía en capa delgada que la composición de cada uno de los extractos es diferente.

Se determinó que el extracto crudo presenta una actividad antiproliferativa ahora en células CaSki.

El único extracto que presentó actividad antiproliferativa fue el extracto de diclorometano esto en concentraciones más bajas que las del extracto crudo y con un porcentaje de citotoxicidad del 35.65 %.

13. SUGERENCIAS.

Se debe tener en cuenta que uno de los inconvenientes en la evaluación de estos extractos es su baja solubilidad, pero se espera que en la separación de los componentes y su evaluación en forma individual ya no presenten ese problema.

Además, se sugiere realizar cromatoplasmas con reveladores selectivos con el fin de tener una idea de las posibles estructuras responsables de la actividad antiproliferativa. Como se muestra a continuación para el extracto crudo.

Sistema de elución	Revelador	Detección	Imagen de la placa
Hexano-Acetato de etilo 3:1	UV	Elución	
Tolueno-Acetato de etilo 93:7	Vainillina-ácido sulfúrico	Terpenos	
Acetato de etilo-metanol-agua 100:13.5:10	Vainillina-ácido sulfúrico	Saponinas	
Acetato de etilo-metanol-agua 100:13.5:10	Acetato de plomo	Flavonoides	

Cuadro 3. Cromatografía en capa delgada del extracto crudo con diferentes reveladores. Esto según la metodología de la literatura para detección de metabolitos secundarios: Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edn. Springer, Berlin. 1995.

14. REFERENCIAS

1. Ojeda P. Efecto Antiproliferativo y Citotóxico del Extracto Acuoso de Agave Pitzometl en Células Tumorales de Cáncer Cervicouterino HeLa. [Tesis]. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
2. Organización Mundial de la Salud [Internet] Ginebra; c1998-2015; [actualizado feb. 2015; citado sep. 2015] Cáncer: Datos y Cifras [aproximadamente 5 pantallas]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11[Database on Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer. c2010-2013 [updated 2013; cited 2015 sep]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
4. Instituto Nacional del Cáncer [Internet] Arizona. Lowy D. [actualizado abr. 2014; citado sep. 2015] Cáncer de Cuello Uterino: Tratamiento [aproximadamente 10 pantallas]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/pro/tratamiento-cuello-uterino-pdq>.
5. Ochoa F, Guarneros D, Velasco M. Infección por Virus del Papiloma Humano en Mujeres y su Prevención. Gaceta Mexicana de Oncología. 2015;14(3):157-163.
6. Mendoza J, Loraine S. Las Plantas Medicinales en la Lucha Contra el Cáncer, Relevancia para México. Rev Mex Cienc Farm. 2010;41(4):18-27.
7. Alfonso R, Costaguta M. Fitoterapéuticos: Calidad y Uso Adecuado. En: Peretta M. Reingeniería Farmacéutica: Principios y Protocolos de la Atención al Paciente. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 321-338.

8. Organización Mundial de la Salud [Internet] Ginebra: c1998-2015; [actualizado feb. 2015; citado sep. 2015] Medicina Tradicional: Definiciones. [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
9. Lock O. Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. En: Villar López M, Villavicencio Vargas O. Manual de Fitoterapia. Lima: EsSalud; 2001 p. 41-63.
10. Asociación Cordobesa de Farmacéuticos Homeopáticos [Internet] Córdoba: Klaine S; 2011 [actualizado oct. 2011; citado sep. 2015], Farmacognosia. [aproximadamente 7 pantallas] Disponible en: <http://www.acfah.org/privado/apuntes/1-farmacognosia/>.
11. Angurell I, Casamitjana N, Caubet A, Dinarés I, Llor N, Torrejo D, et al. [Internet] Barcelona: Universidad de Barcelona; 2009. [actualizado feb. 2015 citado sep. 2015]. Operaciones Básicas del Laboratorio de Química Orgánica; [aproximadamente 3 pantallas] Disponible en: <http://www.ub.edu/oblg/oblg%20castellano/index.html>.
12. Skoog A D, West M, Holler FJ. Fundamentos de Química Analítica. Vol. 2. 4ª ed. Reverte, 2001. P. 664-667
13. Romero A. Cromatografía: Curso de Métodos México: Instituto de Biotecnología; 2002.
14. Carreño C. [Internet] Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011. [actualizado nov. 2011; consulta sep. 2015]. Cromatografía en Capa Fina [aproximadamente 16 pantallas] Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/siguientes/practicas.htm>.
15. Facultad de Química. Manual de Técnicas Cromatográficas. México: UNAM; 2007
16. Calle S. Determinación Analítica de la Cafeína en Diferentes Productos Comerciales. [Tesis]. Universidad Politécnica de Catalunya. 2011
17. Delporte C. Farmacognosia. Chile: Universidad de Chile; 2010.
18. Arango G. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Medellín: Facultad de química farmacéutica. 2010.

19. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM, Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edn. Springer, Berlin. 1995.
20. Stahl E, Glatz A. Optimization of Aldehyde-Sulphuric Acid Reagents for Detection in Thin Layer Chromatography. J. Chromatographic. 1982;243,139-143.
21. Harlev E, Nevo E, Lansky S, Bishayee A. Anticancer Attributes of Desert Plants: A Review. Anti-Cancer Drugs. 2011;23:255–271.
22. Ramos F, Oraday A, Rivas C, Verde M, Cruz D. Cytotoxic Activity of Agave *lechuguilla torr.* J. Biotechnol. 2012;11:1229-1231.
23. Casco L, Ayala N, González C. Monocotiledoneas. En: Cabral E. Introducción al Estudio de las Angiospermas. Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2010. p. 70-100.
24. Elcriso [Internet] Italia; 2008; [actualizado ago. 2015; citado sep. 2015] Agave; [aproximadamente 1 pantalla]. Disponible en: http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/agave.
25. García J. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. 1^a ed. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONAVIO. 2011.
26. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Introducción a la Biología Celular. 2^a ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. 2006.
27. Gonzales M, Ordoñez A. Oncología Clínica. 1^a ed. Madrid. McGraw Hill. 1992.
28. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez P, Anadón R, Sáez F. Biología Celular. 3^a ed. Madrid. McGraw Hill. 2007.
29. Lodsh H, Berk A, Zipusky S. Biología Celular y Molecular. 3^a ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. 2005.
30. Karp G. Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos. 6^a ed. México. McGraw Hill. 2011.
31. Metodología Básica de Bioquímica. País Vasco: González J. [actualizado jun. 2016; citado 31 de agos. 2016] Introducción al Cultivo Celular. Disponible en: http://www.ehu.eus/biofisica/pdf/cultivo_celular.pdf

32. Lazcano E, Ruiz P, Hernández M. Cáncer Cervicouterino: Diagnostico, Prevención y Control. 2ª ed. México. Medica Panamericana. 2005.
33. Displasia [Internet] España; 2014 [actualizado nov. 2014; citado mar 2016] Displasia Cervical; [aproximadamente 1 pantalla]. Disponible en: <http://www.displasia.es/displasia-de-cadera/displasia-cervical/>.
34. Hebner C, Laimins A. Human Papiloma Viruses: Basics Mechanisms of Pathogenesis and Oncogenicity. Reviews in Medical Virology. 2006;16:83-97.
35. Zaldívar G, Ávila J, Molina F, Vega G, Sosa C, Lloret M. Cáncer Cervicouterino y Virus del Papiloma Humano. Rev. Chilena Obstetricia Ginecológica. 2012;77:315-321.
36. Comisión Nacional de Cáncer Cérvico-Uterino. Diagnósticos y Tratamiento Cáncer Cervicouterino. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud, 2004.
37. Noriega G, Noriega L. El Tratamiento Actual del Cáncer Cervicouterino. Ginecología y Obstetricia de México. 2008;76:131-139.
38. Disaia P, Creasman W. Clinical Gynecologic Oncology. 6th edn. Madrid. Mosby, Elsevier. 2002.
39. Sonnenschein C. Soto AM. The Society of Cells: Cancer and Control of cell Proliferation, 1st edn. New York, Bios Scientific Publishers, 1999.
40. Herrera C. Anatomía Patológica: Temas para Enfermería. 1ª ed. México DF. Ecimed. 2005.
41. Vogel A.I. Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th edn. Longman Scientific & technical. New York. 1989.