



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA**

**SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR  
PROGRAMA DE MAESTRIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL  
DE DIFERENTES EXTRACTOS DEL TALLO DE  
*Parmentiera edulis* EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER  
DE MAMA MDA-MB-231”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**



**PRESENTA:  
BIOL. CYNTHIA CAROLINA ESTANISLAO GÓMEZ**

**MEXICO, D. F. 2010**

**DIRECTORES DE TESIS:**

DRA. MARÍA DEL CONSUELO GÓMEZ GARCÍA

DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

**ASESORES:**

DRA. MARÍA ESTHER RAMÍREZ MORENO

DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA

DR. EDUARDO SAN MARTÍN MARTÍNEZ

Esta tesis se realizó en Laboratorio I de Biomedicina Molecular, de la Sección de Estudio de Posgrado e Investigación, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Consuelo Gómez García y Dra. Cynthia Ordaz Pichardo.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con la beca de la Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del I.P.N., como parte del proyecto SIP: 20080309, 20090315 y 20101474. Además también formó parte del proyecto CONACYT con clave 114028.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis padres:

Por su cariño, apoyo y comprensión durante toda mi vida. Porque siempre me han enseñado que debo alcanzar mis metas y no dejarme vencer. Porque con sus palabras y su ayuda han hecho de mí una mejor persona. Y porque siempre han creído en mí. Los QUIERO MUCHO.

A mi hermano y mi abuelita:

Que siempre me han apoyado y han estado a mi lado en todos los momentos, tristes y alegres. Quienes han compartido conmigo desveladas. Los QUIERO MUCHO.

De manera especial quisiera agradecer a la Dra. Consuelo Gómez, ya que desde un inicio confió en mí y en el proyecto, gracias por su orientación, ayuda y paciencia, además de que me permitió formar parte del Laboratorio I, de Biomedicina Molecular, en donde he aprendido muchas cosas.

A la Dra. Cynthia Ordaz, que me guió durante la primera parte del proyecto, así como a los asesores de la tesis, el Dr. Guillermo Pérez, Dr. Eduardo San Martín y Dra. Esther Ramírez, quienes dedicaron su tiempo para la revisión de este trabajo, me aconsejaron y dieron sugerencias.

A todos los miembros del Laboratorio I, quienes fueron indispensables para el desarrollo de la tesis, en especial a Olivia, quien siempre estuvo ahí para orientarme, me tuvo paciencia y de quien aprendí mucho, así como a mis compañeros: Maritere, Julia y Carlos, gracias por su amistad y por compartir grandes momentos.

A los profesores que tuve durante la maestría, los cuales me enseñaron y transmitieron sus conocimientos, indispensables para mi desarrollo profesional.

A Oriana, quien ha sido una gran amiga, me ha apoyado y con quien he compartido muchos momentos.

A Ángel, quien ha formado parte de mi vida y siempre ha estado ahí para apoyarme.

A mis compañeros de maestría: Miriam, Oriana, Carlos, Ervin, Luis y Jesús, de quienes me llevo muy buenos recuerdos.

A los distintos laboratorios de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, del CICATA y del CINVESTAV, en donde me permitieron realizar experimentos que me ayudaron a concluir con el proyecto de maestría.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para el desarrollo de esta tesis

MUCHAS GRACIAS!!!!

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
<b>RESUMEN</b>	<i>i</i>
<b>ABSTRACT</b>	<i>ii</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Características del Cáncer	1
1.2 Muerte celular	2
1.2.1 Apoptosis	5
1.2.2 Tipos de apoptosis: Vía intrínseca y vía extrínseca	6
1.2.2.1 Caspasas	6
1.2.2.2 Vía extrínseca	7
1.2.2.2.1 Proteínas reguladoras de la vía extrínseca	9
1.2.2.3 Vía intrínseca	9
1.2.2.3.1 Proteínas reguladoras de la vía intrínseca	11
1.2.2.4 Sustratos de las caspasas	12
1.2.3 Apoptosis independiente de caspasas	12
1.2.4 Apoptosis y células cancerosas	13
1.2.5 Necrosis	14
1.3 Epidemiología del cáncer.	15
1.3.1 Epidemiología del cáncer a nivel mundial	15
1.3.2 Epidemiología del cáncer a nivel nacional	16
1.4 Cáncer de mama	18
1.5 Tratamientos para el cáncer	19
1.5.1 Cirugía	19
1.5.2 Radioterapia	19
1.5.3 Quimioterapia	20
1.5.4 Terapéutica hormonal	21
1.5.5 Medicina tradicional	22
1.6 Antecedentes	23
1.6.1 Plantas medicinales en el tratamiento del cáncer	23
1.6.2 Familia Bignoniaceae	26
1.6.3 <i>Parmentiera edulis</i>	27
1.6.3.1 Usos tradicionales	29
<b>2. JUSTIFICACION</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo general	32

3.2 Objetivos particulares	32
<b>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
4.1 Material y métodos	34
4.1 Obtención de información etnobotánica, colecta e identificación taxonómica	34
4.1.1 Zona de Colecta	34
4.1.2 Obtención de información etnobotánica	35
4.1.3 Material biológico	35
4.1.3.1 Selección y recolección de la planta	35
4.1.3.2 Dsecación	35
4.1.3.3 Identificación taxonómica	35
4.2 Obtención de los extractos acuoso, acetónico y hexánico	35
4.2.1 Identificación de las principales familias de componentes químicos presentes en los extractos	36
4.2.1.1 Cromatografía en Capa Fina	36
4.2.1.2 Estandarización de la Cromatografía en Capa Fina	36
4.2.1.3 Identificación de metabolitos por Cromatografía de Capa Fina	36
4.2.1.4 Ensayos colorimétricos	37
4.3 Cultivo celular	38
4.4 Ensayos de viabilidad y citotoxicidad	38
4.4.1 Ensayo de MTT	38
4.4.2 Procedimiento de la técnica MTT	39
4.5 Análisis del efecto del extracto en la morfología celular de la línea MDA-MB- 231	39
4.5.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina	39
4.5.1.1 Procedimiento	39
4.5.2 Detección de Apoptosis con Anexina V-FITC	40
4.5.2.1 Procedimiento	40
4.6 Determinación de la fragmentación del ADN	40
4.6.1 Electroforesis en gel de agarosa	40
4.6.2 Ensayo de TUNEL	41
4.6.2.1 Procedimiento	41
4.7 Obtención de extractos proteicos, electroforesis en gel y análisis de la expresión de proteínas por Western Blot	41
4.7.1 Obtención de proteínas citoplasmáticas	41
4.7.2 Separación electroforética de proteínas	41
4.7.3 Inmunodetección (Western Blot)	42
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1 Obtención de datos etnobotánicos, así como colecta e identificación taxonómica	43
5.2 Obtención de los extractos de <i>P. edulis</i>	45

5.2.1 Identificación de las principales familias de componentes químicos presentes en los extractos acuoso, acetónico y hexánico de <i>P. edulis</i>	45
5.2.2 Cromatografía en Capa Fina	45
5.2.2.1 Estandarización del sistema para la separación e identificación de los metabolitos presentes en el extracto acuoso	45
5.2.2.2 Estandarización de la técnica cromatográfica e identificación de los metabolitos en el extracto acetónico	46
5.2.2.3 Estandarización del sistema para la separación e identificación de los metabolitos presentes en el extracto hexánico	47
5.2.3 Ensayos fitoquímicos colorimétricos	53
5.3 Ensayos de viabilidad y citotoxicidad	54
5.3.1 Estandarización de la técnica	54
5.3.2 Evaluación del extracto acuoso sobre la viabilidad de la línea MDA-MB-241	56
5.3.3 Evaluación del extracto acetónico sobre la viabilidad de la línea MDA-MB-231	57
5.3.4 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad de la línea MDA-MB-231	58
5.3.5 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad del cultivo de linfocitos	59
5.3.6 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad de la línea celular MCF10A	61
5.3.7 Obtención del IC <sub>50</sub> del extracto hexánico	62
5.4 Efecto del extracto hexánico sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231	62
5.4.1 Tinción con Hematoxilina y eosina	62
5.4.2 Ensayos con Anexina V	65
5.4.2.1 Tratamiento a las 6 h de exposición	65
5.4.2.2 Tratamiento a las 12 h de exposición	66
5.4.2.3 Tratamiento a las 24 h de exposición	67
5.4.2.3 Tratamiento a las 48 h de exposición	68
5.5 Evaluación del efecto del extracto hexánico en la fragmentación del ADN	72
5.5.1 Electroforesis en gel	72
5.5.2 Ensayo de TUNEL	73
5.6 Expresión de marcadores apoptóticos	75
5.6.1 Análisis de la expresión de la Caspasa 8	76
5.6.2 Análisis de la expresión de la Caspasa 9	77
5.6.3 Análisis de la expresión de la Caspasa 3	78
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>90</b>
<b>10. ANEXOS I Y II</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>TABLAS</b>	
Tabla 1. Características diferenciales de la muerte celular por necrosis y apoptosis	4
Tabla 2. Fármacos antineoplásicos frecuentemente utilizados en la quimioterapia	20
Tabla 3. Sistemas de la fase móvil	33
Tabla 4. Reveladores utilizados para la técnica de Cromatografía en Capa Fina	37
Tabla 5. Reveladores utilizados para los ensayos colorimétricos	37
Tabla 6. Información etnobotánica de <i>P. edulis</i>	43
Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos acuoso, acetónico y hexánico	45
Tabla 8. Sistemas de la fase móvil para la separación de metabolitos en el extracto acuoso	45
Tabla 9. Sistemas para la separación del extracto acuoso	46
Tabla 10. Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos en el extracto acetónico	46
Tabla 11. Sistemas de la fase móvil para la separación de metabolitos en el extracto hexánico	47
Tabla 12. Revelamiento fitoquímico del extracto acuoso, acetónico y hexánico	48
Tabla 13. Metabolitos presentes en extracto acuoso, acetónico y hexánico con la técnica CCF	53
Tabla 14. Análisis fitoquímico colorimétrico de los diferentes extractos	53
Tabla 15. Metabolitos presentes en los diferentes extractos con los ensayos colorimétricos	54
Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto acuoso	56
Tabla 17. Porcentaje de viabilidad de células MDA-MB-231 tratadas con el extracto acetónico	57
Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto hexánico	58
Tabla 19. Porcentaje de viabilidad de linfocitos tratados con el extracto hexánico	60
Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF10A tratada con el extracto hexánico	61
<b>FIGURAS</b>	
Figura 1. Estadios del desarrollo de un tumor	2
Figura 2. Tipos de Muerte celular a) Apoptosis y b) Necrosis	3
Figura 3. Fragmentación del ADN y apariencia del "ADN en escalera" en la apoptosis	5
Figura 4. Vías de apoptosis: extrínseca e intrínseca	8
Figura 5. Formación del complejo apoptosomal durante la vía intrínseca de apoptosis	11
Figura 6. Proceso Necrótico	15
Figura 7. Número estimado de casos de cáncer a nivel mundial, en el año 2007	16
Figura 8. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos entre los años 1997-2006	17
Figura 9. Distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno y sexo en el año 2007	17
Figura 10. Árbol de <i>P. edulis</i>	27
Figura 11. Flor y fruto de <i>P. edulis</i>	28



Figura 12. Distribución de <i>P. edulis</i>	28
Figura 13. Diagrama general de la metodología	33
Figura 14. Ubicación de la zona de colecta, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas	34
Figura 15. Identificación taxonómica de <i>Parmentiera edulis</i> con No. de registro 1766	44
Figura 16. Estandarización del número de células para el ensayo con MTT	55
Figura 17. Estandarización del disolvente y cantidad de MTT para los ensayos de viabilidad	55
Figura 18. Efecto del extracto acuoso en la línea tumoral MDA-MB-231	56
Figura 19. Efecto del extracto acetónico en la línea tumoral MDA-MB-231	57
Figura 20. Efecto del extracto hexánico en la línea tumoral MDA-MB-231	59
Figura 21. Efecto del extracto hexánico en el cultivo primario de linfocitos	60
Figura 22. Efecto del extracto hexánico en la línea celular MCF10A	61
Figura 23. Cálculo del IC <sub>50</sub> del extracto hexánico sobre la línea celular MDA-MB-231	62
Figura 24. Tinción con hematoxilina y eosina de la línea celular MDA-MB-231	64
Figura 25. Ensayos con Anexina V al tiempo de tratamiento de 6 h	66
Figura 26. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 12 h	67
Figura 27. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 24 h	68
Figura 28. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 48 h	69
Figura 29. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células sin tratamiento de los ensayos con Anexina V	70
Figura 30. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con DMSO 0.2% de los ensayos con Anexina V	70
Figura 31. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con Taxol 0.25 µg/ml de los ensayos con Anexina V	71
Figura 32. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con el extracto hexánico a una dosis de 94.63 µg/ml de los ensayos con Anexina V	71
Figura 33. Fragmentación del ADN de las células de la línea MDA-MB-231 expuestas al extracto hexánico	72
Figura 34. Determinación de la fragmentación del ADN, en las células MDA-MB-231, incubadas con el extracto hexánico a través del ensayo de TUNEL	74
Figura 35. Integridad de las proteínas de la línea celular MDA-MB-231, en un gel de acrilamida-SDS al 12%	75
Figura 36. Expresión de la procaspasa 8 en la línea celular MDA-MB-231	76
Figura 37. Expresión de la procaspasa 9 en la línea celular MDA-MB-231	77
Figura 38. Expresión de la caspasa 3 en la línea celular MDA-MB-231	79

## ABREVIATURAS

Asp	Aspartato
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
Bcl-2	gen de linfoma de células B
CARD	Dominio reclutador y de activación de caspasas
CCF	Cromatografía en Capa Fina
Cyt-c	Citocromo c
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DISC	Complejo de inducción de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGCG	Epigallocatequina
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FLIP	Proteínas Inhibidoras de FLICE
IAPS	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
ICAD	Inhibidor de la DNasa activado por caspasa
IC <sub>50</sub>	Índice de citotoxicidad al 50%
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Solución Salina Amortiguada por fosfatos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TNF	Factor de necrosis tumoral
XIAP	Inhibidor de Apoptosis Ligado-X

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada. Esta enfermedad se considera un problema importante de salud a nivel mundial, en México se reportó como la tercera causa de muerte en el 2006. Debido a ello, actualmente existen diversos tratamientos, enfocados en disminuir la proliferación de las células cancerosas. Entre éstos se encuentra la Medicina Tradicional, la cual emplea agentes naturales como las plantas, que contiene principios activos útiles para el tratamiento de esta enfermedad. Asimismo, estudios científicos han demostrado que los agentes naturales poseen una menor toxicidad y mayor eficacia para el tratamiento del cáncer, que algunos fármacos empleados. Así se tiene que plantas como *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae) ha sido utilizada de manera tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos, entre ellos se considera su posible efecto antitumoral. Por tal motivo el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto antitumoral de diferentes extractos del tallo de *P. edulis*, en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Para poder realizar esto, se hicieron ensayos de viabilidad (ensayo de MTT) en las células de cáncer de mama, los cuales indicaron que el extracto que tuvo un mayor efecto antitumoral fue el hexánico, obteniendo un valor IC<sub>50</sub> de 94.63 µg/ml. Además, ensayos de viabilidad realizados en células normales mostraron que el extracto hexánico tuvo un efecto citotóxico menor en linfocitos y en la línea celular de epitelio mamario MCF10A, por lo que el efecto mostrado para las células de cáncer de mama fue específico. Posteriormente se realizaron ensayos para conocer el tipo de muerte celular inducido por el extracto hexánico en las células MDA-MB-231. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto produjo cambios a nivel morfológico, como fueron deformación de la membrana plasmática, reducción del tamaño celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Además los experimentos revelaron que el tipo de muerte celular principalmente inducido fue la apoptosis. La muerte celular se corroboró con la presencia de la fragmentación del ADN en las células de cáncer de mama. Todos estos cambios fueron observados a partir de las 6 h de tratamiento, los cuales fueron incrementando hasta las 72 h. De igual forma, se evaluó la expresión de distintos marcadores de apoptosis como fueron las caspasas 3, 8 y 9, los cuales nos indicaron que el extracto hexánico activó la vía intrínseca o mitocondrial al observar un aumento en la expresión de la caspasa 9 y 3. Por otro lado, el análisis fitoquímico preliminar que se hizo reveló la presencia de terpenos, cumarinas y quinonas en el extracto hexánico, lo cual nos indicó que estos metabolitos están implicados en la actividad citotóxica observada por el extracto en las células de cáncer de mama. En conclusión, el extracto hexánico de *P. edulis* induce muerte celular programada principalmente del tipo de la apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cellular growth. This disease is an important health problem around the world, in Mexico is considered the third cause of death. Actually, there are treatments that decrease the growth of tumoral cells; i.e. Traditional Medicine that uses natural resources as plants, which constituents parts are used to obtain active metabolites useful for cancer's treatment. As a result of this, *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae) is a medicinal plant used traditionally for treatment of diverse illness and maybe as anti-tumoral herb. Some scientifically investigations have demonstrated that natural sources are more efficient for cancer's treatment and are less toxic than usual drugs. Thus, the main objective of the present work was to evaluate the antitumoral properties of different *P. edulis* stem extracts on MDA-MB-231 breast cancer cell line. In order to evaluate it, we performed MTT viability assays on breast cancer cells. Hexanic extract was the most active inducing cytotoxicity on these cancer cells and IC<sub>50</sub> value obtained was 94.63 µg/ml. Therefore, viability assays were also performed with normal cells as lymphocytes and MCF10A epithelial mammary cell line exposed to hexanic extract were less sensitive than MDA-MB-231 cells, showing a selective activity of this extract. Later, to determinate cell death type induced by hexanic extract on MDA-MB-231 cells were made different assays. The data demonstrated that hexanic extract induced morphological changes as plasmatic membrane distortion, cellular size reduction, chromatin condensation and apoptotic bodies formation. Also, experiments showed that apoptosis was the main cell death induced by hexanic extract and these results were supported by DNA fragmentation observed on breast cancer cells exposed to the extract. These changes occurred since 6 until 72 h of treatment. Furthermore, we evaluated protein expression of death cell markers as caspase 3, 8 and 9. Results indicated that hexanic extract activated intrinsic pathway of apoptosis by up-regulating caspase 3 and 9 expression. In the other hand, fitochemistry preliminary analysis showed presence of terpenes, coumarins and quinones in hexanic extract, which indicated that these compounds are related with antitumoral activity of this extract. In summary, *P. edulis* hexanic extract induced mainly an apoptotic programmed cell death on MDA-MB-231 breast cancer cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país esta enfrentándose a numerosos retos en salud, estos retos están condicionados por cambios a los que el ser humano está sujeto y que están enmarcados en el fenómeno de la transición epidemiológica. Bajo esta circunstancia, al aumento de la población y a la expectativa de vida que se ha logrado, se suman los problemas de salud pública como es el cáncer. Es debido a ésto y a los problemas que causa esta enfermedad, no sólo en nuestro país sino a nivel mundial, que existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas para su tratamiento.

### 1.1 Características del Cáncer

Las células normales crecen y proliferan sólo cuando reciben señales o estímulos provenientes de otras células del organismo (hormonas, factores de crecimiento, etc). Los controles que regulan la multiplicación celular se pueden alterar; cuando esto ocurre las células comienzan a crecer y a dividirse en forma descontrolada; cuando estas células tienen descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado son células capaces de expandirse en forma indefinida. Estas células que se originan forman una masa denominada tumor. Algunos de estos tumores son benignos y no tienen consecuencias en la salud, pero otros son malignos y se diseminan por todo el organismo produciendo la enfermedad conocida como cáncer (Lewin, 2007; Lodish, 2002; Weiss, 1997).

El cáncer (o neoplasia) es una enfermedad que se caracteriza fundamentalmente por una proliferación celular descontrolada, localizada en alguna parte específica del cuerpo. El término cáncer ampara más de 100 formas de la enfermedad, de acuerdo con el tejido afectado; incluso dentro de un mismo tejido hay distintas variedades de cáncer con morfología y grado de malignidad diferente (Macdonald, *et al.* 2004; Orozco y Gariglio, 2000).

Las células cancerosas ignoran los controles normales de proliferación y en general crecen respondiendo a señales internas estimuladoras de la proliferación celular; el conjunto celular que se va involucrando crece sin límites bien definidos, infiltrando los espacios que dejan entre sí los tejidos vecinos, logran penetrar a los vasos sanguíneos y linfáticos y a través de la circulación viajan para detenerse en lugares distintos y allí crecen con las mismas características anormales, lo que se denomina como metástasis. Este proceso requiere de la ruptura de la membrana basal. A menudo las células tumorales producen niveles elevados de receptores de superficie celular específicos de las proteínas y los polisacáridos que componen las láminas basales y secretan enzimas que digieren estas proteínas (Lewin, 2007, Weinberg, 2006).

El cáncer se clasifica de acuerdo al tejido y al tipo de célula donde se origina:

- a) Sarcoma, son aquellos tumores que crecen en el tejido conectivo o de soporte (cartílago, huesos, grasa, músculo).
- b) Carcinomas, aquellos que se desarrollan en los epitelios.
- c) Leucemias, se originan en las células hematopoyéticas, como la médula ósea.
- d) Linfomas, se originan en las células del sistema inmune.
- e) Mielomas, se originan en las células del plasma (Weiss, 1997).

El proceso de transformación de una célula normal a una célula cancerosa, es una secuencia de alteraciones celulares que perturban un tejido estableciendo una lesión premaligna que acaba por establecer una hiperplasia que se transforma en una displasia y culmina con la invasión y la metástasis (Figura 1).

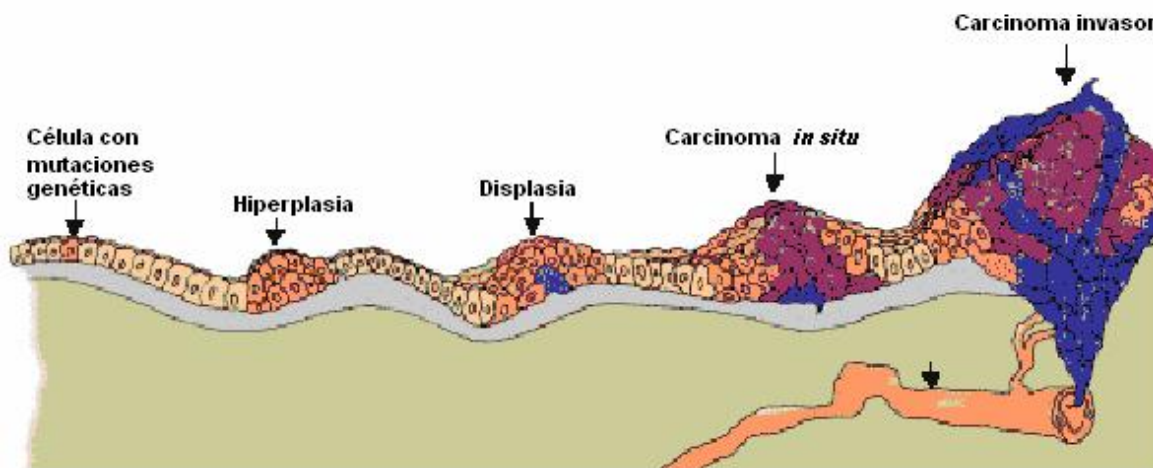


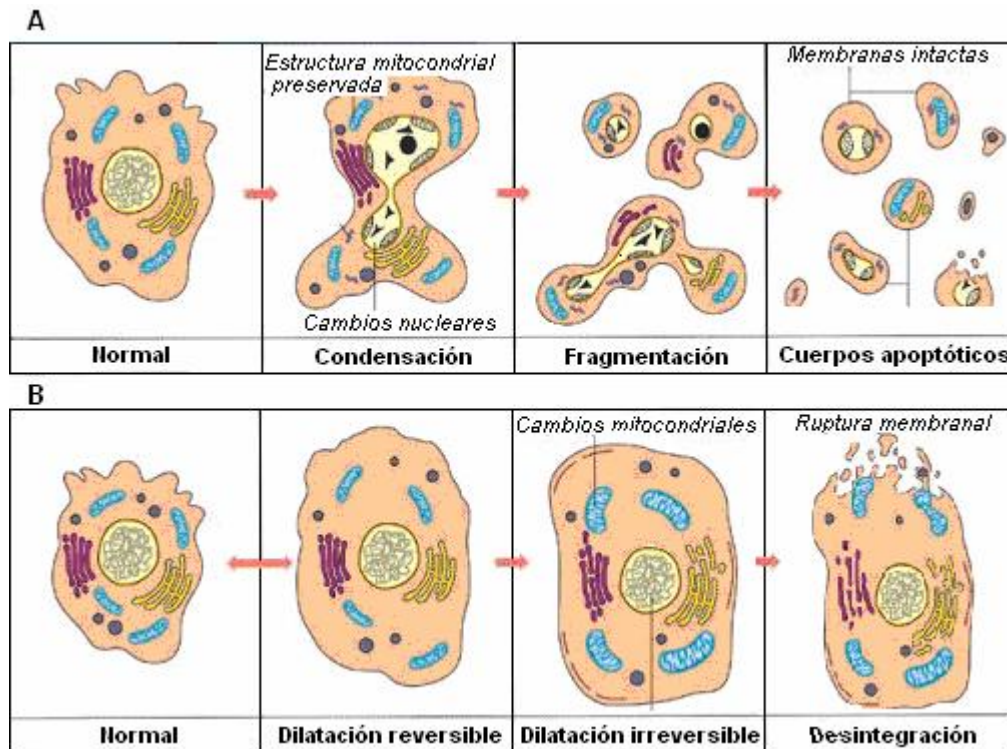
Figura 1. Estadíos del desarrollo de un tumor (Modificada de Weinberg, 1996).

El macro y el microambiente participan en favorecer cuando menos el 80 % del cáncer en los seres humanos. Hay agentes ambientales plenamente identificados que son carcinogénicos como los tóxicos del humo del cigarro que se absorben en el tracto respiratorio y se distribuyen en todo el organismo, los rayos ultravioleta y los rayos X, los asbestos, que directamente dañan el ADN, son mutagénicos y estimulan la proliferación celular. Así mismo, hay agentes endógenos que pueden ser mutagénicos como los radicales libres de oxígeno (Lodish, *et al.* 2002; Weiss, 1997).

## 1.2 Muerte celular

La muerte de las células puede producirse por múltiples causas, como daño mecánico, infección por virus u otros microorganismos, acción de agentes químicos tóxicos o por acumulación de

sustancias de desecho. La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la apoptosis y la necrosis (Figura 2) (Fulda y Debatin, 2006, Degterev, *et al*, 2003, Fan, *et al*. 2005).



**Figura 2. Tipos de Muerte celular a) Apoptosis y b) Necrosis** (Modificado de Roche Diagnostics GmbH, 2008).

La muerte celular por apoptosis (programada) es una muerte fisiológica, que implica la activación de mecanismos específicos. Se produce de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y muere en beneficio del organismo. Su función puede ser la eliminación de células superfluas en un lugar determinado. Durante el ciclo celular, se produce apoptosis mediada por el gen supresor p53 u otros mecanismos cuando el ADN presenta alteraciones, evitándose así la generación de células anormales (Fan, *et al*. 2005, Alfaro, *et al*. 2000).

La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Durante este proceso las células se hinchan y sufren un deterioro de su estructura y organización, así como el progresivo cese de sus funciones (síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, respiración, etc.) que acaba por impedir su viabilidad y conduce a la rotura de la

membrana externa y la lisis. Ello ocasiona la liberación de material celular al medio, que suele provocar a su vez reacciones inflamatorias (Alfaro, *et al.* 2004).

En la Tabla 1 se enumeran las diferencias entre estos dos tipos de muerte celular.

Tabla 1. Características diferenciales y significado de la muerte celular por necrosis y apoptosis (Modificado de Roche Diagnostics GmbH, 2008).

<b>APOPTOSIS</b>	<b>NECROSIS</b>
<b>Características morfológicas</b>	
Deformación de la membrana, sin pérdida de la integridad	Pérdida de la integridad de la membrana Destrucción precoz
Agregación de la cromatina en la membrana nuclear interna	Desintegración de la cromatina
Condensación y o reducción celular	Dilatación de la célula y lisis
Formación de vesículas limitadas por membrana (cuerpos apoptóticos)	No hay formación de vesículas, lisis completa
No hay desintegración de los organelos y permanecen intactos	Desintegración de los organelos
<b>Características bioquímicas</b>	
Proceso muy regulado, que implica pasos enzimáticos y de activación	Pérdida de la regulación de la homeostasis iónica
Requiere energía (ATP) (proceso activo, no sucede a 4°C)	No requiere energía (proceso pasivo, también sucede a 4°C)
Fragmentación del ADN en mono- y oligonucleosomas, no al azar	Digestión del ADN al azar
Fragmentación del ADN (primer evento de muerte celular)	Fragmentación postlítica del ADN (último evento de muerte celular)
<b>Significado fisiológico</b>	
Muerte de células individuales	Muerte de grupos de células
Inducida por estímulos fisiológicos	Originada por estímulos no fisiológicos
Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos	Fagocitosis por macrófagos
Respuesta no inflamatoria	Respuesta inflamatoria significativa



### 1.2.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso necesario para la homeostasis y la morfogénesis. Este es un mecanismo ordenado, la célula muere sin dañar a las células vecinas con el contenido de su citoplasma, además la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el ADN se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada (Ghobrial, *et al.* 2005; Schönthal, 2008).

La fragmentación del ADN nuclear (Figura 3) es uno de los aspectos moleculares de la apoptosis mejor definidos, se ha considerado la causa desencadenante de todo el proceso de apoptosis y el responsable de las manifestaciones morfológicas. Lo primero que ocurre es una rotura a gran escala debido a la actividad de endonucleasas, las cuales originan fragmentos de 190, 000 a 240,000 pb. Estos fragmentos son atacados por otra endonucleasa y convertidos en fragmentos más pequeños de 30, 000 a 50, 000 pb. A su vez, sobre estos últimos actúa una tercera endonucleasa, que se expresa constitutivamente dependiendo de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y que se inhibe por  $Zn^{2+}$  y ácido aurín-tricarboxílico. Esta última endonucleasa de aproximadamente 18 kDa, similar a la DNAsa I, corta selectivamente el ADN en puntos localizados entre los nucleosomas y origina fragmentos mono- y oligonucleosomales de ADN, de 180 a 200 pb o múltiplos de ese tamaño (Schönthal, 2008).

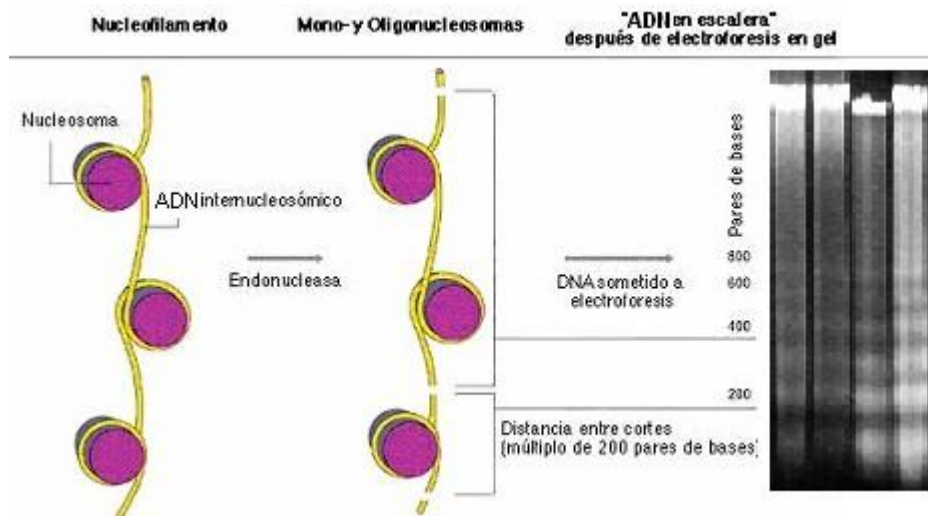


Figura 3. Fragmentación del ADN y apariencia del "ADN en escalera" en la apoptosis (Modificado de Zhang y Bhavnani, 2005).

Se piensa que las primeras fragmentaciones modifican la conformación del ADN y dejan las uniones entre nucleosomas accesibles a la última acción enzimática. Sin embargo, algunos casos de apoptosis descritos no se ajustan a este modelo de fragmentación del ADN (Schönthal, 2008).

### 1.2.2 Tipos de apoptosis: Vía intrínseca y vía extrínseca

Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles (Figura 4). La primera es mediante la vía extrínseca o citoplasmática a través del receptor de muerte Fas, el cual es miembro de la familia de Factor de Necrosis Tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*), estos receptores de muerte tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis. Mientras que la segunda vía es la intrínseca o mitocondrial, la cual ocurre cuando los estímulos llevan a la mitocondria a liberar el citocromo *c* y por consiguiente a activar las señales de muerte. Ambas vías convergen al final, involucrando la activación de las proteasas llamadas caspasas que cortan moléculas reguladoras y estructurales culminando en la muerte celular (Fulda y Debatin, 2006; Degterev, *et al*, 2003; Ghobrial, *et al*. 2005).

#### 1.2.2.1 Caspasas

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas que cortan sustratos después de residuos de aspartato (Asp) dentro de secuencias de reconocimiento tetra o pentapéptido- específicas. Existen 14 diferentes caspasas identificadas en mamíferos expresadas en muchos tipos celulares, de éstas 11 se encuentran en seres humanos (Fan, *et al*. 2005).

Las caspasas están presentes en las células en forma inactiva como procaspasas o zimógenos (30-50 kDa). Éstas cortan proteínas clave en la célula algunas como la laminina, que al romperse desintegra la membrana nuclear, o bien, degradan a la enzima que inactiva a la DNAsa ocasionando la fragmentación del material genético (Degterev, *et al*, 2003).

Las caspasas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad larga (p20) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG, y una subunidad pequeña (p10) en el extremo C-terminal. El prodominio y la subunidad larga están separados por un lugar de corte en Asp, y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos motivos de corte en Asp. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación (Degterev, *et al*, 2003; Fan, *et al*. 2005).

Basados en su estructura y secuencia, las caspasas se pueden dividir en iniciadoras o efectoras:

a) Caspasas iniciadoras: estas caspasas poseen prodominios largos y son capaces de activar a las caspasas efectoras mediante procesos proteolíticos, además de que interaccionan con proteínas adaptadoras específicas. Sus prodominios largos poseen uno o dos dominios de interacción proteína-proteína denominados: dominio efector de muerte (DED, del inglés *Death Effector Domain*), en el caso de las caspasas 8 y 10; y un dominio reclutador y de activación de caspasas (CARD, del inglés *Caspase Activation and Recruitment Domain*), en el caso de las caspasas 1, 2, 4, 5, 9, 11 y 12. De entre ellas, las caspasas 1, 5 y 11 además de controlar la actividad apoptótica también controlan las respuestas inflamatorias. Estas caspasas se activan al entrar en contacto entre ellas, mediante la unión de sus prodominios largos con complejos moleculares adaptadores que estimulan la homodimerización (Chen y Wang, 2002; Fan, *et al.* 2005).

b) Caspasas efectoras: están constituidas por las caspasas 3, 6 y 7, las cuales son más abundantes y contienen un prodominio corto; además fragmentan proteínas reguladoras y estructurales siendo responsables directas de las características apoptóticas (Ghobrial, *et al.* 2005; Fan, *et al.* 2005). La activación de las caspasas es iniciada por ambas vías la extrínseca y la intrínseca (Figura 4).

### 1.2.2.2 Vía extrínseca

Los receptores de muerte forman un subgrupo de la superfamilia TNF que incluye más de 20 proteínas con funciones como: regulación de muerte celular, diferenciación o regulación del sistema inmune; entre estos receptores se encuentran: receptor 1 de TNF (TNF-R1), CD95 (Fas/APO-1) y el Receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL-R1 y TRAIL-R2), así como DR3 y DR6. Los receptores de muerte se caracterizan por poseer un dominio extracelular, el cual contiene repetidos ricos en cisteína y un dominio intracelular de alrededor de 80 aminoácidos denominado dominio de muerte (DD, del inglés *death domain*), el cual es importante para la transmisión de las señales apoptóticas desde la superficie celular hacia el interior de la célula (Fulda y Debatin, 2006; Ghobrial, *et al.* 2005).

Cuando el ligando se une, los receptores de muerte interactúan a través de sus dominios de muerte con los correspondientes dominios proteicos de moléculas adaptadoras como FADD (Dominio de muerte asociado a Fas, del inglés *Fas Associated Protein with Death Domain*). Estas moléculas adaptadoras también contienen un segundo dominio de interacción proteico, denominado DED en el extremo N-terminal, el cual facilita su unión al prodominio DED de la procaspasa-8. Estos componentes forman el complejo de inducción de muerte (DISC, del inglés *Death Inducing Signalling Complex*), el cual activa a la caspasa-8 a través de un mecanismo de dimerización inducido por proximidad. En este punto, una alta concentración de la caspasa-8 dimerizada promueve su propia activación (autocatalítica) y la subsecuente activación de las proteínas efectoras (Ghobrial, *et al.* 2005; Shi, 2004).

La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular.

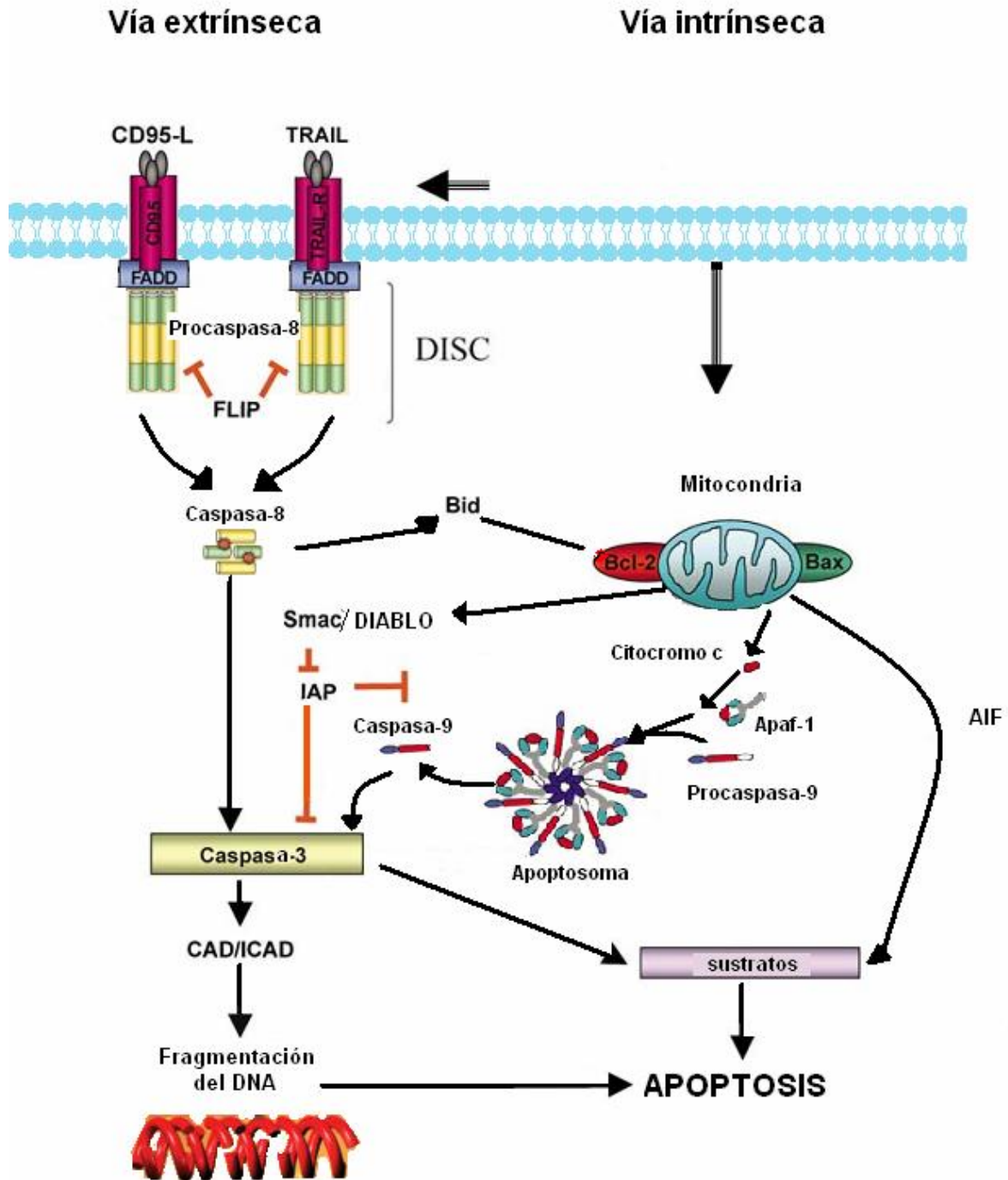


Figura 4. Vías de apoptosis: extrínseca e intrínseca (Modificado de Fulda y Debatain, 2006).

### 1.2.2.2.1 Proteínas reguladoras de la vía extrínseca

La vía extrínseca está regulada por proteínas inhibidoras FLIP (Proteínas Inhibidoras de FLICE, del inglés *Flice Inhibitory Protein*), que contienen dos dominios DED y que se unen al complejo CD95-FADD. Estas proteínas inhiben el reclutamiento y la activación de la caspasa-8. Estas proteínas tienen una estructura parecida a la caspasa-8 pero carecen del dominio proteasa-catalítico. Una sobreexpresión de FLIP provoca una eficiente competencia con la caspasa 8 por su unión al complejo DISC (Ghobrial, *et al.* 2005; Fulda y Debatin, 2006).

### 1.2.2.3 Vía intrínseca

En la vía mitocondrial, la activación de las caspasas está relacionada con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Numerosos estímulos citotóxicos y señales proapoptóticas convergen en la mitocondria para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial. Dicha permeabilización está regulada no sólo por proteínas de la familia Bcl-2 sino también por lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo metabólico y componentes que brindan permeabilidad a los poros. Con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, un número de proteínas normalmente encontradas en el espacio intermembranal mitocondrial son liberadas, entre ellas el citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y la endonucleasa G. Una vez liberadas al citosol, estas proteínas apoptogénicas desencadenan la muerte celular al activar las caspasas (Fulda y Debatin, 2006; Dubin y Stoppani, 2000).

El citocromo c funciona de manera normal en el proceso de transporte de electrones de la cadena respiratoria, generando ATP. Se considera que la permeabilización forma poros en la membrana que regulan la liberación del citocromo c hacia el citosol. La familia de Bcl-2 regula este proceso. Esta familia consta de 19 miembros que se han clasificado en tres grupos basándose en similitudes estructurales y funcionales.

Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados dominios de homología con Bcl-2 (BH): BH1-BH4.

a) Los miembros del grupo I, como Bcl-2 y Bcl-XL, poseen actividad antiapoptótica y se caracterizan por tener los cuatro dominios BH (BH1-BH4). Además poseen una cola hidrofóbica en el C-terminal que localiza la proteína en la membrana externa de la mitocondria. Éstos inhiben la liberación del citocromo c.

b) El grupo II consta de miembros con actividad proapoptótica, como por ejemplo Bax y Bak. Tienen estructura similar a las del grupo I, pero carecen del dominio BH4. Estudios de estructura y

función sugieren que la actividad anti y proapoptótica está determinada por una región relativamente larga que incluye dos hélices que participan en la inserción a la membrana. Este tipo de proteínas proapoptóticas están involucradas en la permeabilización de la membrana como resultado de la formación de poros en la membrana externa mitocondrial.

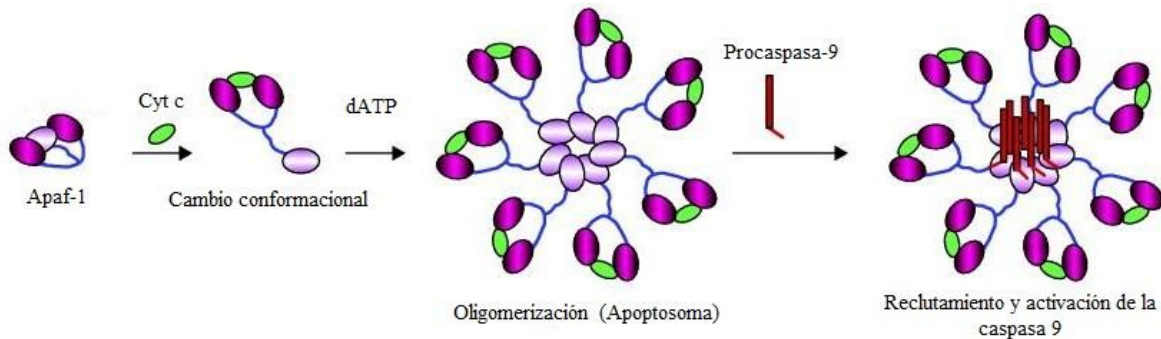
c) Los miembros del grupo III también tienen actividad proapoptótica. Todos ellos se caracterizan por la presencia de un único dominio BH3, además pueden o no tener región transmembranal. Los miembros más característicos son Bid, Bad, Bim, Bik, los cuales actúan como reguladores al controlar la activación alostérica de proteínas como Bax y Bak (García, et al, 2005; Fulda y Debatin, 2006; Ghobrial, *et al*, 2005).

La liberación del citocromo c promueve la activación de la caspasa 3 a través de la formación del complejo llamado apoptosoma (formado por las moléculas citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9) (Figura 5). Una vez en el citosol el citocromo c sirve como un cofactor, el cual se une a la región C-terminal de Apaf-1, que es una proteína con un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasa (CARD). Esta unión facilita la asociación de dATP con Apaf-1 y provoca que se exponga su extremo N-terminal CARD, lo que permite la oligomerización para reclutar a la procaspasa 9 (mediante una interacción CARD-CARD). Así como DISC, el apoptosoma es una molécula de alto peso molecular que sirve de plataforma para la activación de las caspasas. Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa-9 tiene un efecto mínimo en su activación. El requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con el cofactor Apaf-1. La activación de la caspasa-9 es debida a un cambio conformacional, no a proteólisis (Fulda y Debatin, 2006; Dubin y Stoppani, 2000).

De manera consecutiva la procaspasa 3 es reclutada hacia el apoptosoma, donde es activada por la caspasa 9. Ahora la caspasa 3 activada puede cortar diferentes sustratos en la célula para producir cambios morfológicos y bioquímicos que generen la apoptosis (Ghobrial, *et al*. 2005; Fan, *et al*. 2005).

A pesar de que ambos tipos de vías pueden ocurrir en forma lineal se han identificado dos distintos prototipos de células a través de las cuales se induce la apoptosis. En las células tipo I, la caspasa 8 es activada hasta la formación de DISC, en cantidades suficientes de esta caspasa se induce la activación de las caspasas efectoras. Sin embargo, en las células tipo II, la cantidad de la caspasa-8 activada generada es insuficiente para activar a la caspasa 3, por lo que se requiere activar la vía mitocondrial para a su vez generar la activación de las caspasas efectoras. En este caso la caspasa 8, corta y activa a la proteína proapoptótica Bid, perteneciente a la familia Bcl que contiene un dominio BH3, la cual cataliza la liberación del citocromo c. El corte de la proteína Bid provoca la activación de la vía mitocondrial (Dubin y Stoppani, 2000). La mayoría de las veces la

muerte celular ocurre a través de la vía intrínseca o mitocondrial, la cual se activa a través de señales generadas como daño al ADN y pérdida de la adhesión, entre otros.



**Figura 5. Formación del complejo apoptosomal durante la vía intrínseca de apoptosis**  
(Modificado de Segal, *et al.* 2005).

### 1.2.2.3.1 Proteínas reguladoras de la vía intrínseca

A pesar de que la liberación del citocromo c hacia el citosol promueve la activación de la caspasa 3 a través de la formación del apoptosoma, moléculas como Smac/Diablo y Omi/HtrA2 promueven de manera indirecta la activación de la caspasa mediante la inhibición de moléculas antagonistas como las IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis, del inglés *inhibitory apoptosis proteins*). Existen al menos cinco diferentes tipos de estas proteínas inhibidoras en mamíferos: XIAP (Inhibidor de Apoptosis Ligado-X, del inglés *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), c-IAP1, c-IAP2, IAP neuronal y survivina. Todas ellas poseen una actividad antiapoptótica *in vitro*. El espectro de estímulos apoptóticos que son bloqueados por las IAPs de mamíferos es amplio e incluye ligandos y transductores de la familia de receptores de TNF, miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, el citocromo c y agentes quimioterapéuticos. XIAP tiene una amplia y enorme capacidad antiapoptótica. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 son inhibidores directos de caspasas. Todos ellos se unen e inhiben a las caspasas 3 y 7 activas y también a la procaspasa 9, pero no a las caspasas 1, 6, 8 ni 10 (Deveraux, *et al.*1998).

La inhibición de la actividad de las IAPs, provoca que exista un equilibrio dinámico entre las moléculas pro y antiapoptóticas. Las IAPs pueden bloquear la activación de las caspasas iniciada por la liberación de una pequeña cantidad de citocromo c. Sin embargo, en ocasiones en donde existe un fuerte daño mitocondrial, el estado antiapoptótico establecido por moléculas como las IAPs se puede inhibir mediante concentraciones altas en el citosol de proteínas como Smac/Diablo y Omi/HtrA2 a las cuales se unen (Fulda y Debatain, 2006).

#### 1.2.2.4 Sustratos de las caspasas

Una vez activadas, las caspasas efectoras cortan alrededor de 400 sustratos incluyendo proteínas involucradas en la transducción de señales, proteínas reguladoras de la transcripción, componentes reguladores del ciclo celular y proteínas involucradas en la replicación y reparación del ADN. Para muchos de los sustratos identificados las consecuencias funcionales no han sido identificadas. En otros casos, la proteólisis de ciertos componentes puede generar cambios morfológicos. Ejemplo de esto es el inhibidor de DNasa llamado ICAD (del inglés *inhibitor of caspase-3-activated DNase*). El corte de ICAD por la caspasa 3 libera a la nucleasa activa CAD, lo cual genera la fragmentación del ADN. El corte de otros sustratos, incluyendo la gelsolina así como las cinanas ROCK-1 y PAK2, está implicado con la deformación de la membrana que caracteriza a las células apoptóticas. Además las caspasas destruyen muchas proteínas que se requieren para el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto, como los filamentos intermedios de citoqueratina 18, que están involucrados en la organización de los filamentos; así como la proteólisis de actina o fodrina que provoca la pérdida de la forma celular, mientras que la degradación de la laminina induce una contracción nuclear (Saraste y Pulkki, 2000).

Un gran porcentaje de los sustratos de las caspasas están involucrados en la adhesión celular y en las uniones comunicantes célula-célula. Sin embargo, la activación de las caspasas no es necesariamente sinónimo de muerte celular, ya que por un lado es aparente que las células pueden sobrevivir aún con cierta activación de las caspasas y que la inhibición de las caspasas bloquea las manifestaciones morfológicas de la apoptosis, pero esto no influencia la muerte celular final. Además ciertas caspasas como la caspasa-1 están involucradas en la regulación de la inflamación, más que en la apoptosis. Además las caspasa también pueden participar en procesos no apoptóticos de proliferación celular y diferenciación (Fulda y Debatin, 2006; Ghobrial, *et al.* 2005; Fan, *et al.* 2005).

#### 1.2.3 Apoptosis independiente de caspasas

En la ejecución de la apoptosis independiente de caspasa también están involucradas proteínas del espacio intermembranal que se liberaban al citosol ante la señal de muerte. Entre estas últimas destacan el AIF (factor inductor de apoptosis), especies reactivas de oxígeno (ROS), la HtrA2/Omi (serin proteasa mitocondrial), Ca<sup>++</sup> y la endonucleasa G (Endo G) (Fan, *et al.* 2005).

AIF es una flavoproteína mitocondrial que se encuentra de manera soluble pero puede liberarse hacia el citosol y traslocarse al núcleo ante la activación de ciertos programas de muerte celular. Al traslocarse al núcleo se une al ADN de forma secuencia-independiente donde induce cambios nucleares y recluta endonucleasas que provocan la fragmentación del ADN a gran escala (50 kb)



de forma caspasa-independiente. La actividad de AIF es importante durante el desarrollo temprano de mamíferos y en células deficientes de los componentes del apoptosoma y caspasas.

Así mismo se sugiere que Omi/HtrA2 promueve la muerte celular independiente de caspasas debido a su actividad como serin proteasa (Cregan, *et al*, 2004).

El calcio es un catión que participa como mensajero en muchas rutas bioquímicas y puede ser parte de señales de muerte o de proliferación (Hu, *et al*, 2005).

La endonucleasa G también es una proteína mitocondrial mediadora de la apoptosis. Ante el daño por estrés oxidativo o activación de los receptores de muerte membranales, endoG se libera de la mitocondria y se trasloca al núcleo provocando la fragmentación internucleosomal del ADN de forma caspasa-independiente, para ello, endoG se trasloca al núcleo donde induce la fragmentación del ADN. Tanto la endoG, como AIF pueden también provocar la condensación de la cromatina (Kim, *et al*, 2000).

Durante la activación de las vías independientes de caspasas también participan otras proteasas como las cisteín proteasas (cis catepsinas o calpaínas) o las serín proteasas, granzimas o el mismo proteosoma. Algunas de éstas son liberadas de otros organelos, como el retículo endoplásmico o los lisosomas (Fulda y Debatain, 2006).

La granzima B puede cortar proteínas después de residuos de aspartato y por lo tanto activar a la caspasa-3. Esta vía induce la apoptosis de manera directa.

A pesar de que la vía de apoptosis y transducción de señales tiene un papel crucial en la eliminación de células tumorales en respuesta a agentes citotóxicos utilizados en el tratamiento del cáncer en pacientes, el significado de la apoptosis como mecanismo principal de muerte celular en pacientes con cáncer ha sido cuestionado. Además de la apoptosis, las células cancerosas han mostrado ser eliminadas de manera eficiente después del daño al ADN mediante necrosis, catástrofe mitótica o autofagia. Por lo tanto, los tipos de muerte celular no apoptótica han sido considerados en respuesta hacia agentes citotóxicos (Fulda y Debatain, 2006).

#### **1.2.4 Apoptosis y células cancerosas**

Las células normales, ante ciertos estímulos, disparan la cascada de eventos de muerte celular o quedan arrestadas en alguna de las fases del ciclo celular en espera de la reparación del daño, si es que hay alguno. Por el contrario, en la mayoría de las células cancerosas, la maquinaria de apoptosis es defectuosa como resultado de una serie de mutaciones adquiridas que no permiten la correcta activación de los puntos de control del ciclo celular, ni la activación de la apoptosis cuando

ésta es necesaria, es decir, son resistentes a la apoptosis y no detienen el ciclo celular aún ante el daño, haciéndose inmortales (Hanahan y Weinberg, 2000).

Debido a ello las células cancerosas han desarrollado numerosas estrategias para resistir la muerte celular inducida tanto por la vía extrínseca, como por la vía intrínseca.

Las señales en respuesta a la formación del complejo ligando-receptor pueden ser inhibidas por el incremento de moléculas antiapoptóticas o por la disminución o pérdida de la función de proteínas proapoptóticas. Altos niveles de la proteína Bcl-2 promueven el desarrollo de células tumorales, prolongando la supervivencia de la célula. La expresión en la superficie celular de receptores de muerte puede variar entre las diferentes células y estar ausente o subexpresada en ciertos tipos de tumores (Johnstone, *et al.* 2002).

Altos niveles de caspasa 3 y 8 han sido observados en células tumorales sin la presencia de apoptosis, esto debido a que en células tumorales, altos niveles de IAPs inactivan la función de las caspasas. Es por ello, que el proceso de apoptosis resulta muy relevante en el transcurso del desarrollo del cáncer, debido a ello muchos de los fármacos que actualmente se utilizan están enfocados a inducir este proceso en las células tumorales (Johnstone, *et al.* 2002).

### **1.2.5 Necrosis**

En la muerte celular ocasionada por necrosis hay ruptura de la membrana plasmática, dilatación de los organelos, expansión del citoplasma, vacuolación, así como una condensación moderada de la cromatina. Cuando las células se hinchan vierten su contenido hacia los espacios vecinos y promueven una respuesta inflamatoria. La necrosis se considera como una muerte celular accidental, no controlada, la cual se caracteriza por ser un proceso independiente de energía. Todos los eventos resultan en la pérdida de la función de la homeostasis y daño en la membrana que conlleva a la ruptura celular (Syntichaki y Tavernarakis, 2002).

Durante la necrosis se observa un incremento intracelular de calcio. Este aumento provoca la despolarización de la membrana interna mitocondrial y disminución de la producción de ATP; esta disminución impide que los canales en la membrana funcionen, incrementando la actividad de proteasas como las calpaínas. Éstas últimas se activan cuando la concentración de calcio se eleva, provocando una ruptura en la membrana lisosomal. Los lisosomas contienen alrededor de 80 diferentes tipos de enzimas entre las que se encuentran las catepsinas. Las catepsinas son proteasas las cuales son liberadas en el citoplasma después de la ruptura lisosomal. En el citoplasma, estas enzimas degradan estructuras celulares e interfieren con el metabolismo provocando la muerte celular (Figura 6) (Syntichaki y Tavernarakis, 2002).

Sin embargo se ha observado que la necrosis puede ser un proceso derivado de la activación ligando-receptor o en la quimioterapia, en donde las condiciones suponen una muerte celular por apoptosis (Festjens, et al 2006).

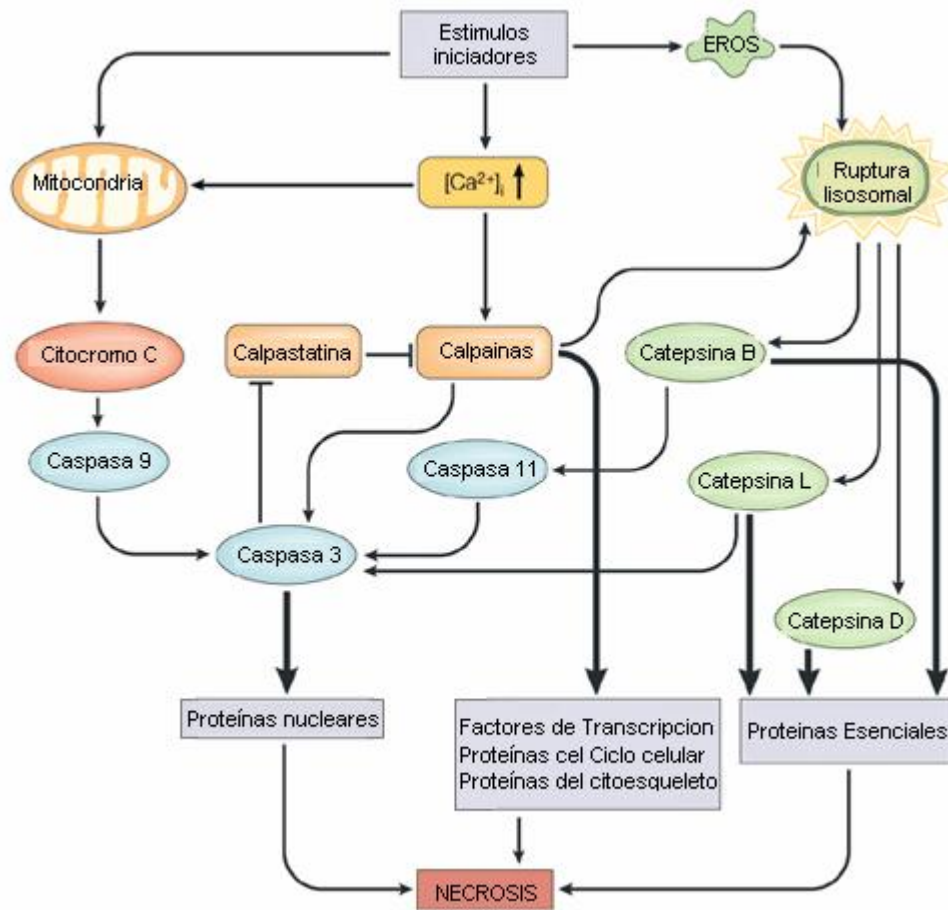


Figura 6. Proceso Necrótico (Modificado de Syntichaki y Tavernarakis, 2002).

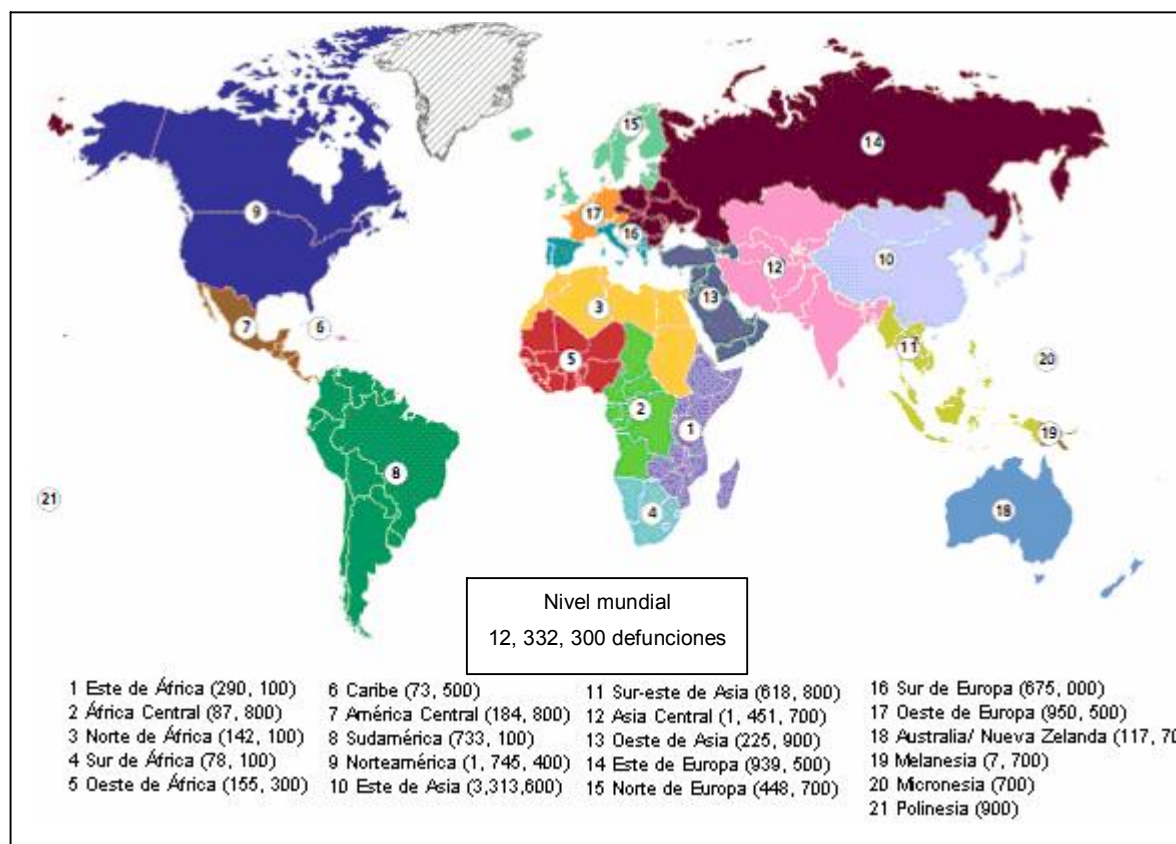
### 1.3 Epidemiología del cáncer

#### 1.3.1 Epidemiología del cáncer a nivel mundial

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial, a esta enfermedad se le atribuyen cerca de 12,3 millones de defunciones (aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en el año 2007 (Figura 7). De los cuales, los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad son de: pulmón (1,4 millones de defunciones), estómago (866 000 defunciones), hígado (653 000 defunciones), colon (677 000 defunciones) y mama (548 999 defunciones).

Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en el 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (ordenados según el número de defunciones mundiales) fueron los siguientes:

- a) En hombres: cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata.
- b) En mujeres: cáncer de mama, cérvico-uterino, pulmón, estómago y colon-recto (OMS, 2008; García, *et al.* 2007).



**Figura 7. Número estimado de casos de cáncer a nivel mundial, en el año 2007**  
(Tomado de OMS, 2008).

### 1.3.2 Epidemiología del cáncer a nivel nacional

Debido a estas cifras, el cáncer constituye un problema importante de salud pública para México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó en el 2007 que los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en el país, registrándose 63 888 personas fallecidas por esta causa, lo cual representa el 12.9% del total de las defunciones registradas.

La Figura 8 muestra el porcentaje de defunciones causadas por tumores malignos para varios años, total y por sexo.

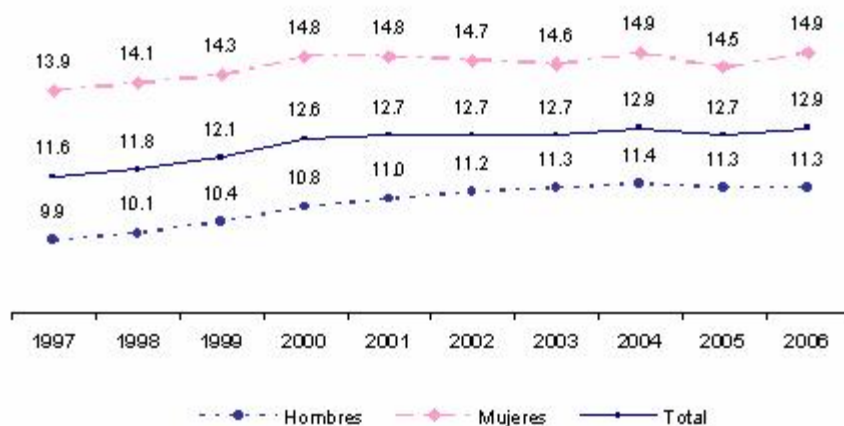


Figura 8. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos entre los años 1997-2006 (Tomado de INEGI 2007).

En las mujeres, el 15% de las defunciones por tumores malignos corresponden al de mama y el 13.9% al de cuello del útero; el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó un 9.2% de las muertes registradas, mientras que en los hombres, el 17.1% corresponden a cáncer de próstata y el 16.6% al de tráquea, bronquios y pulmón (Figura 9) (INEGI, 2007).

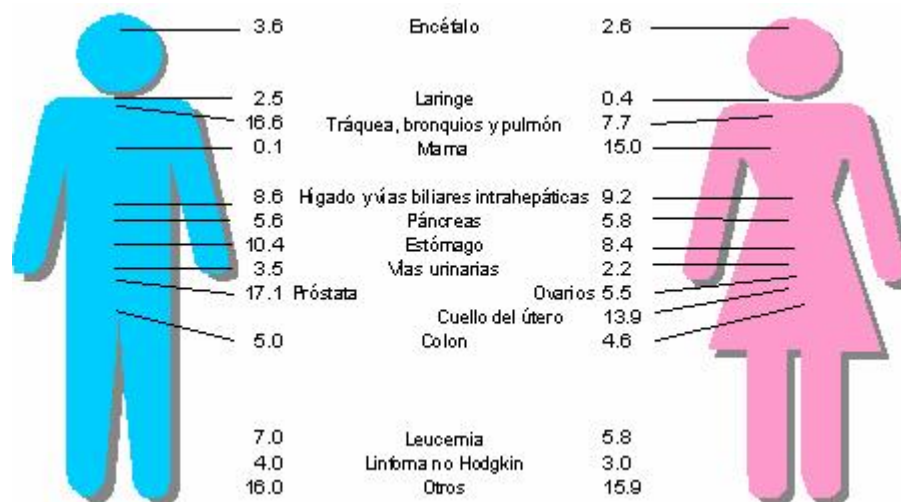


Figura 9. Distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno y sexo en el año 2007 (Tomado de INEGI, 2007).

Entre los datos proporcionados por el INEGI en el 2007 se ha reportado que la principal causa de muerte de mujeres entre 25 y 64 años son el cáncer de mama y el cérvico-uterino.

## 1.4 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en México (INEGI, 2006); se considera como una neoplasia que suele generarse en las células que revisten los conductos mamarios o en los lóbulos de la glándula mamaria. El 20% de los casos de cáncer de mama es de características no invasivas; el resto suele invadir los tejidos más allá de los conductos y la glándula mamaria.

El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal (80% de los casos), seguido por el carcinoma lobular (10-15%) (National Cancer Institute, 2008). Las hormonas tienen un papel fundamental en el desarrollo de la mayoría de los casos de cáncer de mama, en especial los estrógenos.

Los factores de riesgo para este tipo de cáncer se agrupan en tipos: reproductivos, alimenticios, genéticos, ambientales, edad y de estilo de vida:

- Reproductivos, como empezar los periodos menstruales a temprana edad y atravesar la menopausia a edad avanzada; el uso de terapia hormonal de reemplazo durante la menopausia y por periodos superiores a tres años; ausencia de embarazo, entre otros.
- Alimenticios, como obesidad, ingesta frecuente de alimentos ricos en grasas animales y grasas saturadas, escasa ingesta de alimentos con alto contenido en fibra y vitaminas A y C, entre otros.
- Ambientales, como exposición a productos químicos o contaminantes ya sea por ingesta, contacto o respiración, entre otros.
- Edad, mientras envejece la mujer, mayor es el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Tres cuartos de las pacientes con cáncer de mama son mujeres mayores de 50 años de edad. Las mujeres menores de 30 años representan el 0.5% de las pacientes con cáncer de mama.
- Genéticos, como tener parientes sanguíneos cercanos con historia de la enfermedad incrementa los riesgos de desarrollar cáncer de mama. Entre el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios. El cáncer de mama, como otras formas de cáncer, es considerado el resultado de el daño ocasionado al ADN, debido a ello se han identificado diversos genes que presentan anormalidades y cuyos productos proteicos participan en la patología del cáncer de mama como son: *BRCA1*, *BRCA2*, *p27*, *p53*, *BCL2*, *c-myc*, *PTEN*, *CHEK2*, *HER2*, entre otros.

A pesar de que muchos riesgos epidemiológicos y cofactores biológicos y promotores han sido identificados, la causa primaria aún es desconocida.

El cáncer de mama se clasifica en cuatro etapas, de acuerdo al tamaño del tumor y a su extensión hacia los ganglios linfáticos y a otras partes del cuerpo. Las dos primeras son tempranas y las otras dos son tardías. En las etapas iniciales o tempranas el tumor es pequeño (mide menos de 5 cm) y está limitado a la glándula mamaria y se cura hasta el 95% de los casos.

Existen distintos tratamientos para el cáncer de mama entre ellos se encuentran: la cirugía, radioterapia, mastectomía, quimioterapia y terapia hormonal, entre otros. El tratamiento depende del tipo, tamaño y grado de expansión del tumor (NOM-041-SSA2-2002).

## **1.5 Tratamientos para el cáncer**

Actualmente, los principales métodos utilizados son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, estas formas de tratamiento frecuentemente se aplican asociadas. La quimioterapia puede disminuir los síntomas, prolongar la vida y promover la cura de esta enfermedad. Hoy en día, se dispone de 141 fármacos comerciales que se emplean en el tratamiento del cáncer, los cuales actúan bajo mecanismos diferentes para evitar que las células cancerosas se reproduzcan. Sin embargo, existen otros tratamientos en los cuales la medicina tradicional hace uso de plantas medicinales para el tratamiento del cáncer (De Vita, *et al*, 2001; Weiss, 1997; Lazcano, 2000).

### **1.5.1 Cirugía**

La cirugía es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se debe extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas hayan sido eliminadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos a ella (De Vita, *et al*, 2001; Lazcano, 2000).

### **1.5.2 Radioterapia**

La radioterapia es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa) para eliminar las células tumorales (cancerígenas), en la parte del organismo donde se apliquen. La radioterapia actúa sobre el tumor, destruyendo las células malignas y así impide que crezcan y se reproduzcan.

Esta acción también puede ejercerse sobre los tejidos normales; sin embargo, los tejidos tumorales son más sensibles a la radiación y no pueden reparar el daño producido de forma tan eficiente como lo hace el tejido normal, de manera que son destruidos bloqueando el ciclo celular. La radioterapia sigue siendo junto con la cirugía y la quimioterapia, uno de los tres pilares del tratamiento del cáncer. Se estima que más del 50% de los pacientes con cáncer tienen un

tratamiento con radioterapia para el control tumoral o como terapia paliativa en algún momento de su evolución (De Vita, *et al.*, 2001; Lazcano, 2000; Macdonald, *et al.* 2004).

### 1.5.3 Quimioterapia

La quimioterapia incluye el uso de fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas.

Mientras que la cirugía y la radioterapia destruyen o dañan las células cancerosas en un área específica, la quimioterapia funciona en todo el cuerpo. Los medicamentos para quimioterapia pueden destruir las células cancerosas que han hecho metástasis o se han propagado a otras partes del cuerpo alejadas del tumor primario (tumor original).

Hoy día se utilizan más de 100 medicamentos para quimioterapia en varias combinaciones. Aún cuando puede utilizarse un solo medicamento para tratar el cáncer, por lo general los medicamentos son más eficaces si se usan combinados (quimioterapia combinada). Este tipo de tratamiento permite que los medicamentos con diferentes tipos de acción trabajen juntos para destruir un mayor número de células cancerosas y reducir la posibilidad de que se vuelvan resistentes a un medicamento de quimioterapia en particular (De Vita, *et al.*, 2001; Weiss, 1997).

Los fármacos antitumorales actúan sobre las células con alta tasa de división mediante la inhibición del crecimiento y proliferación celular (Tabla 2). Cabe mencionar que no sólo actúan sobre las células tumorales sino que también sobre las células normales y su efecto es aun más notorio en células con alta tasa de división (por ejemplo, células del folículo piloso, médula ósea, tracto gastrointestinal y sistema reproductor) lo que provoca efectos secundarios y puede comprometer aún más la salud del paciente. Estos efectos van desde la náusea, el vómito y la diarrea leve hasta daño al riñón y corazón, descensos en el número de leucocitos y problemas de fertilidad, dependiendo del fármaco utilizado (Ratain, *et al.* 2001).

Tabla 2. Fármacos antineoplásicos frecuentemente utilizados en la quimioterapia.

Compuesto	Tipo	Actividad	Mecanismo de acción
Cisplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al ADN, generación de radicales libres, con activación de p53 y síntesis de Bax y activación del sistema



			receptor/ligando CD95
Carboplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al ADN y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar al cisplatino
Oxalplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al ADN y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar al cisplatino
5-Fluoracilo	Antimetabolito	Análogo de la pirimidina	Bloquea a la Timidilato sintetasa, esencial para la formación de ADN.
Metotrexato	Antimetabolito	Análogo de ácido fólico	Inhibe la dihidrofolato reductasa interfiriendo con síntesis de timidilatos y por ende del ADN
Etopósido	Inhibidor de la topoisomerasa	Inhibe función de la cromatina	Daño al ADN, activación de p53 y caspasas
Ciclofosfamida	Mostaza nitrogenada	Alquilante, por metabolitos hidroxilados	Citotóxico por daño al ADN
Busulfan	Alquil sulfonado	Alquilante, entrecruzamiento de ADN y ARN	Unión covalente al ADN
Paclitaxel	Taxano	Inhibidor mitótico, previene despolimerización microtubular	Vía de p53 y activación de genes de respuesta a estrés e induce liberación de catepsina B desde lisosomas
Adriamicina (doxorubicina)	Antibiótico (antraciclinas)	Se intercala entre el ADN, radicales libres	Inhibe síntesis de ADN y ARN

#### 1.5.4 Terapéutica hormonal

Existe otro tipo de tratamiento del cáncer, la terapia hormonal el cual ha progresado debido a que comprende la síntesis y metabolismo endógenos de los esteroides, al desarrollo de nuevos agentes hormonales sintéticos y al descubrimiento de receptores de la hormona esteroidea. El crecimiento tumoral dependiente de hormonas se inhibe cuando se suspende la producción de hormona endógena por medio de la extirpación quirúrgica de su origen (ovario, testículos, suprarrenales, etc). De manera similar, la administración de dosis farmacológicas de hormonas, o

de sus antagonistas causa la regresión del tumor en ciertos tipos de cánceres (Macdonald, *et al.* 2004; Lazcano, 2000).

### 1.5.5 Medicina tradicional

La medicina tradicional es la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias de los indígenas de diferentes culturas, las cuales usan para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de las enfermedades físicas y mentales. Un instrumento muy importante de la medicina tradicional son las plantas medicinales (WHO, 2000).

Las plantas medicinales son aquellas especies vegetales que contiene en toda o alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades (WHO 2002-2005).

El uso de ellas es parte de la historia misma de la humanidad. Es una práctica que el ser humano ha empleado desde tiempos muy antiguos, ya que en cierta forma el uso de las plantas medicinales representaba una ventaja selectiva para sobrevivir en los diferentes tipos de hábitats. En la actualidad este hecho es particularmente importante en países como México, ya que se considera entre los primeros países con mayor diversidad cultural y biológica; en él se entrelazan y combinan diferentes culturas, cada una de ellas con una singular visión del mundo y un amplio conocimiento de las plantas medicinales de acuerdo a su interrelación con la naturaleza (Juscáfresca, 1995).

Las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer, y juegan un papel muy importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Se ha descrito que en la medicina tradicional de muchos países, más de 3 mil especies de plantas se utilizan con este propósito. Así, más del 60% de los agentes anticancerígenos actualmente en uso, derivan de una u otra forma de fuentes naturales que incluyen plantas, organismos marinos y microorganismos (Linares, *et al.*, 1999).

México es un país con una gran biodiversidad botánica y una amplia tradición en el uso de la medicina herbolaria. De acuerdo con diferentes fuentes bibliográficas se concluye que en México se han empleado 238 especies de plantas pertenecientes a 78 familias botánicas para tratar enfermedades consistentes con la sintomatología de cáncer. Para corroborar este conocimiento etnomédico, es necesario realizar investigaciones científicas empleando modelos *in vitro* (en células o componentes celulares), *in vivo* (utilizando animales de laboratorio), así como estudios clínicos en seres humanos (Laza, *et al.*, 2003).

## 1.6 Antecedentes

Las investigaciones realizadas desde el producto natural hasta la obtención de las moléculas responsables de la actividad antitumoral, puede ser considerado el ciclo más completo de una planta utilizada para el tratamiento del cáncer (Laza, *et al.* 2003).

### 1.6.1 Plantas medicinales en el tratamiento del cáncer

Actualmente, están en estudio una amplia variedad de familias de plantas con efecto antitumoral, entre éstas se encuentran las familias Umbelliferae, Euphorbeaceae, Papaveraceae, Annonaceae, Agavaceae, Cactaceae, Leguminosae, Bignonaceae y Ulmaceae, entre otras; de las cuales se emplean diferentes partes ya sea la raíz, hoja, tallo, corteza, flores o fruto para observar su acción antitumoral en distintos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los compuestos aislados de los extractos de plantas que presentan actividad anticancerígena, encontramos: alcaloides, terpenos, flavonoides y taninos, entre otros (Graham, *et al.* 2000).

Algunas de las plantas que han sido caracterizadas por su potencial anticancerígeno son: *Rhoe discolor*, *Physalis peruviana*, *Pereskia bleo*, *Smilax glabra*, *Piper longum*, *Argemone mexicana*, *Vitis vinifera*, *Viscus album*, entre otras.

Estudios acerca del efecto del extracto acuoso de la planta mexicana *R. discolor* sobre un modelo murino de cáncer de hígado, han demostrado que la administración del extracto a una dosis de 20 mg/kg reduce el número y área de las lesiones neoplásicas (Rosales, *et al.* 2008).

Se han realizado pruebas en plantas como *P. peruviana* (Solanaceae), cuyo extracto etanólico induce un arresto en el ciclo celular y apoptosis a través de la activación de la vía intrínseca o mitocondrial en las líneas tumorales: HepG2 y Hep3B, por lo cual se considera que posee una potente actividad anticancerígena (Wu, *et al.* 2003).

Asimismo estudios utilizando un extracto metanólico de la planta *P. bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) en la línea celular de cáncer de mama T-47D mostraron una actividad citotóxica. Análisis de ciertas características de la apoptosis, muestran el efecto que tiene el extracto sobre la fragmentación del ADN y la expresión de marcadores moleculares como p53, c-myc y Caspasa-3, los cuales incrementaron su expresión cuando se trataba a las células con el extracto metanólico, concluyendo que el extracto de la planta posee componentes bioactivos importantes para disminuir el crecimiento de las células tumorales (Tan, *et al.* 2005).

*S. glabra* Roxb. es una planta utilizada para el tratamiento de padecimientos en el hígado y ha sido reportada como un agente anticancerígeno. Estudios en líneas celulares de hepatomarcinomas

HepG2 y Hep3B han demostrado que el extracto metanólico tiene un efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis. El extracto provocó un arresto de las células en la fase S o S/G2. En cuanto a la inducción de la apoptosis se observó fragmentación del ADN así como una despolarización de la membrana mitocondrial indicando la activación de la vía intrínseca, con la expresión de moléculas como Cyt c, Caspasa-3 y PARP, además de la activación de p38 y JNK. Análisis fitoquímicos posteriores demostraron la presencia de flavonoides (astilbina) y saponinas (esmilagenina), los cuales pudieran estar implicados en la actividad antitumoral del extracto de la planta (Sa, *et al.* 2008).

En otro estudio en donde se analizó el efecto de extracto etanólico de *Trigonella foenum*, se observó que éste disminuyó la viabilidad celular e indujo cambios en la morfología celular que provocaron la muerte celular por apoptosis. Estos cambios incluyeron una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, exposición de la fosfatidil-serina, fragmentación del ADN y arresto en la fase G2/M del ciclo celular (Sebastian y Raghava, 2007).

Otra planta en la que se ha identificado que posee una actividad anticancerígena es *P. longum*, en donde los extractos alcohólicos de los frutos de la planta y su componente piperina han sido estudiados debido a su actividad antitumoral e inmunomoduladora. Análisis realizados en líneas celulares con el linfoma de Dalton y el linfoma de Ehrlich han de mostrado que el extracto alcohólico es 100% tóxico a una concentración de 500 mg/ml en el caso del linfoma de Dalton y a una concentración de 250 mg/ml en el linfoma de Ehrlich. La administración del extracto (10mg/dosis/animal), así como de la piperina (1.14mg/dosis/animal) pueden inhibir los tumores sólidos en ratones inducidos, incrementando la expectativa de vida en el modelo animal (Sunila, *et al.* 2004).

Estudios realizados con el extracto de las hojas de *A. mexicana* han demostrado que la mezcla de polisacáridos presente en ella, muestran actividad antitumoral, cuando se aplica sólo o junto a dos citostáticos, en ratones inoculados con células tumorales de leucemia linfocítica P-388 y Sarcoma 37. La mezcla de polisacáridos provoca un rechazo a la implantación del tumor de Ehrlich y su administración conjunta con el citostático 5-Fluoracilo produce un incremento moderado de la actividad antitumoral en los ratones portadores del tumor Sarcoma 37 (Rita, *et al.* 2005).

Asimismo, extractos de frutos como los arándanos (*Vaccinium spp.*) y las uvas (*Vitis vinifera*) poseen un potencial anticancerígeno, debido a la presencia de compuestos como las proantocianidinas. La actividad de estos compuestos se ha evaluado en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón, adenocarcinoma gástrico y carcinoma escamoso oral (CAL27 y SCC25). Con respecto a éstos últimos, la proliferación de ambas líneas celulares fue significativamente inhibida con la administración de los extractos de las semillas de estas plantas de manera dosis-

dependiente. Además se observó que los reguladores de apoptosis, caspasa-2 y caspasa-8 fueron sobreexpresados durante el tratamiento. Sin embargo, los extractos de las semillas de ambas plantas provocaron algunos cambios en la adhesión celular, morfología celular y en las vías reguladoras del ciclo celular. Además, estudios acerca de los efectos quimiopreventivos que pueden tener los compuestos de la uva sugirieron su utilidad para reducir el daño que los agentes quimioterapéuticos causan a las células normales (Chatelain, *et al*, 2008; Ye, *et al*. 1999).

*V. album* es una planta parasitaria que crece en los pinos y manzanos. Los extractos acuosos se emplean como medicinas complementarias en la terapia del cáncer. Varios estudios clínicos han demostrado que las preparaciones con esta planta mejoran la calidad de vida de los pacientes con cáncer. Entre los componentes biológicamente activos presentes en los extractos acuosos de *V. album* se encuentran las lectinas, viscotoxinas, polifenoles y polisacáridos. En varios modelos experimentales de implantación tumoral *in vivo*, el tratamiento con los extractos de la planta o con la lectina purificada se asoció con regresión tumoral. Asimismo, diversos estudios *in vitro* demostraron que el extracto de la planta posee efectos citotóxicos sobre varias células tumorales. Los mecanismos implicados en la actividad antitumoral son complejos e involucran apoptosis, angiogénesis e inmunomodulación. Se propone que los mecanismos inmunomodulatorios podrían complementar los efectos antitumorales, resultando en una efectiva regresión del tumor (Elluru, *et al*. 2007).

Por otro lado, el té negro o té verde son hechos a base de *Camelia sinensis*. El té verde contiene polifenoles monoméricos conocidos como flavonoles y el té negro contiene flavonoles y polifenoles poliméricos conocidos como teaflavinas y tearubiginas. Entre estos polifenoles, se encuentran las catequinas. Estudios *in vitro* han evaluado el efecto antitumoral de cuatro principales catequinas presentes en la planta: EC (epicatequina), ECG (epicatequina, 3-gallato), EGC (epigallocatequina) y EGCG (epigallocatequina-3-gallato); de las cuales, la EGCG posee una mayor actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer de próstata y ovario. El mecanismo de acción de este compuesto es a través de la inhibición de la proliferación y transformación celular; además de que se sugiere un efecto quimioprotector (Ravindranath, *et al*. 2006).

Tal ha sido el éxito de las plantas como fuente para aislar compuestos bioactivos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad o menor toxicidad que en la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta. Durante los últimos años se han identificado más de 40 fármacos activos contra el cáncer que tienen diferentes blancos y repercusiones a nivel celular. Algunos de los fármacos comúnmente utilizados en la quimioterapia y que han sido obtenidos de fuentes naturales son: etopósido,

vincristina, vinblastina, paclitaxel y camptotecina, entre otros (Barquero, 2007, Pushkarev, *et al.* 2004).

### 1.6.2 Familia Bignoniaceae

La Familia Bignoniaceae comprende alrededor de 110 géneros y unas 750 especies de árboles y arbustos a nivel mundial, los cuales tienen una distribución tropical y subtropical, sin embargo algunos se localizan en zonas templadas. En México existen 17 géneros de esta familia, entre los que encontramos *Tecoma spp.*, *Adenocalymma spp.*, *Bignonia spp.*, *Catalpa spp.*, *Jacaranda spp.* y *Parmentiera spp.*, entre otros. Éste último, corresponde al género de la planta que se va a evaluar en este trabajo (Rzedowsky y Rzedowsky, 2001).

A nivel de esta Familia existen reportes que han demostrado la presencia de compuestos como saponinas, taninos, quinonas y alcaloides. Los géneros mejor estudiados han sido *Tabebuia spp.* y *Kigelia spp.* (Trease y Evans 1986, Daniel, 2006).

Uno de los compuestos mejor caracterizados es el denominado lapachol, que es una naftoquinona, la cual fue aislada por primera vez de la corteza del árbol *Tabebuia avellanedae* y a la cual se le atribuyen distintas propiedades entre ellas: antiviral, bactericida, fungicida, antiséptico, antiinflamatorio y antitumoral. Este compuesto se ha aislado de distintas especies de la familia Bignoniaceae (*Haplophragma spp.*, *Heterophragm spp.*, *Phyllarthron spp.*, *Radermachera spp.*, *Stereospermum spp.*, *Catalpa spp.*, *Melloa spp.*, *Newbouldia spp.*, *Macfadyena spp.*, y *Millingtonia spp.*), sin embargo también ha sido aislado de familias como Leguminosae, Malvaceae, Scrophulariaceae, entre otras (Daniel, 2006). Se ha propuesto que la actividad antitumoral de este compuesto, se debe a su interacción con los ácidos nucleicos, la interacción de las subunidades de la naftoquinona con la cadena de ADN, lo que provoca una inhibición en la replicación y la transcripción (Hussain, *et al.* 2007). La actividad citotóxica de distintos derivados sintéticos del lapachol como el mono-o-quinona derivado del  $\beta$ -lapachol y el pirano-1,4- naftoquinona se han estudiado en distintas líneas celulares de cáncer de pulmón, mama, estómago y colon, observando una disminución en la proliferación de las células tumorales (Steves-Souza, *et al.* 2007).

Otro género de la familia Bignoniaceae estudiado debido a su actividad anticancerígena es *Kigelia africana*, el extracto de los frutos de esta planta se ha utilizado en la etnomedicina para el tratamiento de distintos tipos de cáncer como el de piel, mama y gastrointestinal; el extracto de los frutos inhibe tanto la apariencia como el desarrollo del tumor cuando se aplica una dosis de 100 mg/kg (Kolodziej, 1997).

### 1.6.3 *Parmentiera edulis*

*P. edulis* es una planta de la familia Bignoniaceae (Figura 10) que posee diversos nombres comunes entre ellos: cuajilote, chote, pepino de árbol, chachi, turi, tzutu, aceitillo hoja de lanza, entre otros (Pennington y Sarukan, 2005).

La taxonomía la ha ubicado de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Scrophulariales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Parmentiera*

Especie: *edulis* (Kunth) Seem.

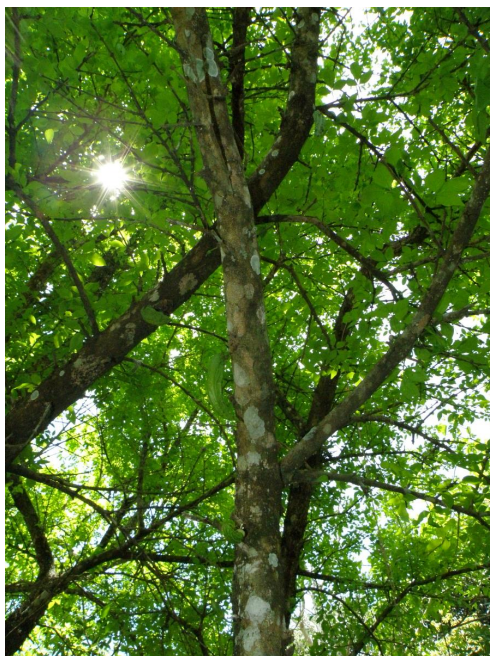


Figura 10. Árbol de *P. edulis*

Es un árbol pequeño de hasta de 5 m de alto y 36 cm de diámetro, ramificándose a baja altura, robusto y de copa muy amplia; corteza externa lisa, rojiza con capas papiráceas desprendibles; corteza interna rojiza, grosor total de la corteza de 32 mm; hojas dispuestas en espiral, imparipinnadas de 28 a 36 cm de largo, compuestas por 6 a 7 pares de folíolos opuestos o alternos de 4.5 a 7 cm de largo por 3 a 3.5 cm de ancho, obovados a ligeramente lanceolados, margen entero, ápice obtuso a mucronado, base obtusa a ligeramente atenuada: verde rojizos en el haz y verde claros en el envés; panículas de hasta 27 cm de largo, flores hermafroditas y pequeñas con

corolas hasta de 2 mm de diámetro, pétalos de color amarillo-cremoso; drupas dispuestas en panículas hasta de 27 cm de largo, aplanadas y brillantes, de un color dorado cuando maduras, elípticas de 8 a 10 mm; las semillas se encuentran rodeadas por una ligera resina (Figura 11) (Pennington y Sarukan, 2005).



Figura 11. Flor y fruto de *P. edulis*.

Es originaria de México y se distribuye desde el centro de México hasta Honduras (Figura 12). Habita en clima cálido: semi-cálido y templado desde los 2 m hasta los 2 240 m de altura. Crece en huertos y está asociado con la selva tropical caducifolia y perennifolia, se encuentra también en el matorral xerófilo y bosque mesófilo de montaña, es común que crezca en potreros y linderos (Pérez, *et al.*1998).



Figura 12. Distribución de *P. edulis*.



### 1.6.3.1 Usos tradicionales

Desde hace tiempo se ha reportado el uso de esta planta, en el siglo XVI Francisco Fernández relata su uso como antigripal, diurético, para la sordera y para la sordera por el frío. A mediados del siglo XVII, Ricardo Ossado señala su acción para problemas relacionados con la vejiga. En el siglo XX, Maximino Martínez refiere los siguientes usos: antigripal, antidiabético catártico, para la fiebre tiroidea, gastroenteritis, otitis externa, sedante, para la sordera y las vías urinarias (Sorela, 2006).

Hoy en día, este árbol se sigue utilizando de diferentes maneras tradicionales, como laxante y diurético en varias regiones del centro y sur del país, principalmente en el Estado de México, el Distrito Federal, Hidalgo y Puebla. Se recomienda, también, para tratar padecimientos de riñón y su tratamiento incluye al fruto, la corteza, las flores y la raíz, mismas que se hierven e ingieren como té. Además la cocción de la flor, la raíz o el fruto, resulta un buen diurético. También se emplea para otras enfermedades como asma, garraspera, gripa y tos; se hierven las flores con tejocote y se endulzan para beberlo tibio en ayunas durante dos semanas. La resina tiene propiedades vomitivo-purgantes. En Veracruz y Quintana Roo, se come el fruto sancochado y se utiliza para padecimientos tan diversos como el dolor de cabeza, la sordera y la diarrea. Las crónicas coloniales mencionan a la fruta de este árbol como una de las verduras que se cultivaban en los patios o cercos de las casas y que formaban parte de la dieta habitual de algunos pueblos donde este árbol prosperaba (Sorela, 2006).

Su fruta se utiliza popularmente en el tratamiento de la diabetes mellitus en diversas regiones de los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas. En cuanto a este uso se han realizado estudios en ratones diabéticos, para evaluar su efecto hipoglucemiante observando que los extractos clorofórmicos de hojas y frutos de la planta poseen un efecto dosis-dependiente para el tratamiento de diabetes (Pérez et al, 1998). Más tarde aislaron la molécula lactucin-8-O-metilacrilato de extractos clorofórmicos del fruto de la planta para evaluar dicha actividad, se observó que al administrar este compuesto vía intraperitoneal a ratones diabéticos, disminuían los niveles de glucosa en la sangre, observándose un mayor efecto después de 4 h de haber administrado el compuesto al ratón, además que este efecto permanecía por un periodo largo de tiempo (Pérez, *et al*, 2000; Hernández *et al*, 2002).

En el estado de Tamaulipas, en el Municipio de Gómez Farias, datos etnobotánicos obtenidos en esta zona (Tabla 3), indican que las personas utilizan la corteza del tallo de *P. edulis* conocida como “chote”, para hacer infusiones, las cuales toman diariamente, para aliviar algunos padecimientos, entre ellos se cree que pudiera tener un posible efecto antitumoral ya que la infusión es utilizada para curar “piedras o bultos” en riñones y en el pecho, por eso se cree que se pudiera tratarse de un remedio para el cáncer de estómago, hígado, riñón y pecho. Además de que

se ha descrito que árboles de la familia Bignoniaceae poseen metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, quinonas, los cuales pudieran estar involucrados en conferir dichas propiedades antitumorales (Ordaz y Maldonado, 2006).

## 2. JUSTIFICACION

El cáncer representa un problema importante de salud pública a nivel mundial. Particularmente, en nuestro país los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en el año 2007. Actualmente este padecimiento es tratado principalmente aplicando quimioterapia, radioterapia y cirugías, todos encaminados hacia la disminución o eliminación de los tumores y de los síntomas para prolongar la vida y promover la regresión de esta enfermedad.

Sin embargo existe una alta toxicidad y multiresistencia hacia las drogas que se utilizan en este tipo de tratamientos, de ahí la importancia de realizar investigaciones encaminadas hacia la identificación de nuevos agentes naturales antitumorales. En la actualidad existen evidencias clínicas de las propiedades antitumorales de un gran número de productos obtenidos de plantas que presentan menor toxicidad que los actuales tratamientos empleados.

En México, existen plantas con propiedades anticancerígenas pertenecientes a diferentes familias que son utilizadas por pobladores de distintas regiones del país para combatir esta enfermedad. Particularmente, en el Municipio de Gómez Farias en el Estado de Tamaulipas, los pobladores utilizan de forma rutinaria e importante la planta *P. edulis* para tratar las llamadas “piedras o bultos” en los riñones y pecho. Por tal motivo, esta planta representa un posible blanco de estudios científicos para identificar los componentes que confieren dichas propiedades anticancerígenas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antitumoral de diferentes extractos de la corteza de tallo de *Parmentiera edulis* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener información etnobotánica, coleccionar la planta e identificar taxonómicamente.
- Elaborar los extractos acuoso, acetónico y hexánico de *P. edulis*; así como identificar de las principales familias de compuestos químicos presentes en éstos.
- Determinar el efecto de los diferentes extractos sobre la viabilidad de las líneas celulares en estudio.
- Analizar el efecto del extracto sobre la morfología celular de la línea celular tumoral.
- Determinar el efecto del extracto sobre la fragmentación del ADN.
- Determinar la expresión de marcadores de muerte celular.

#### 4.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

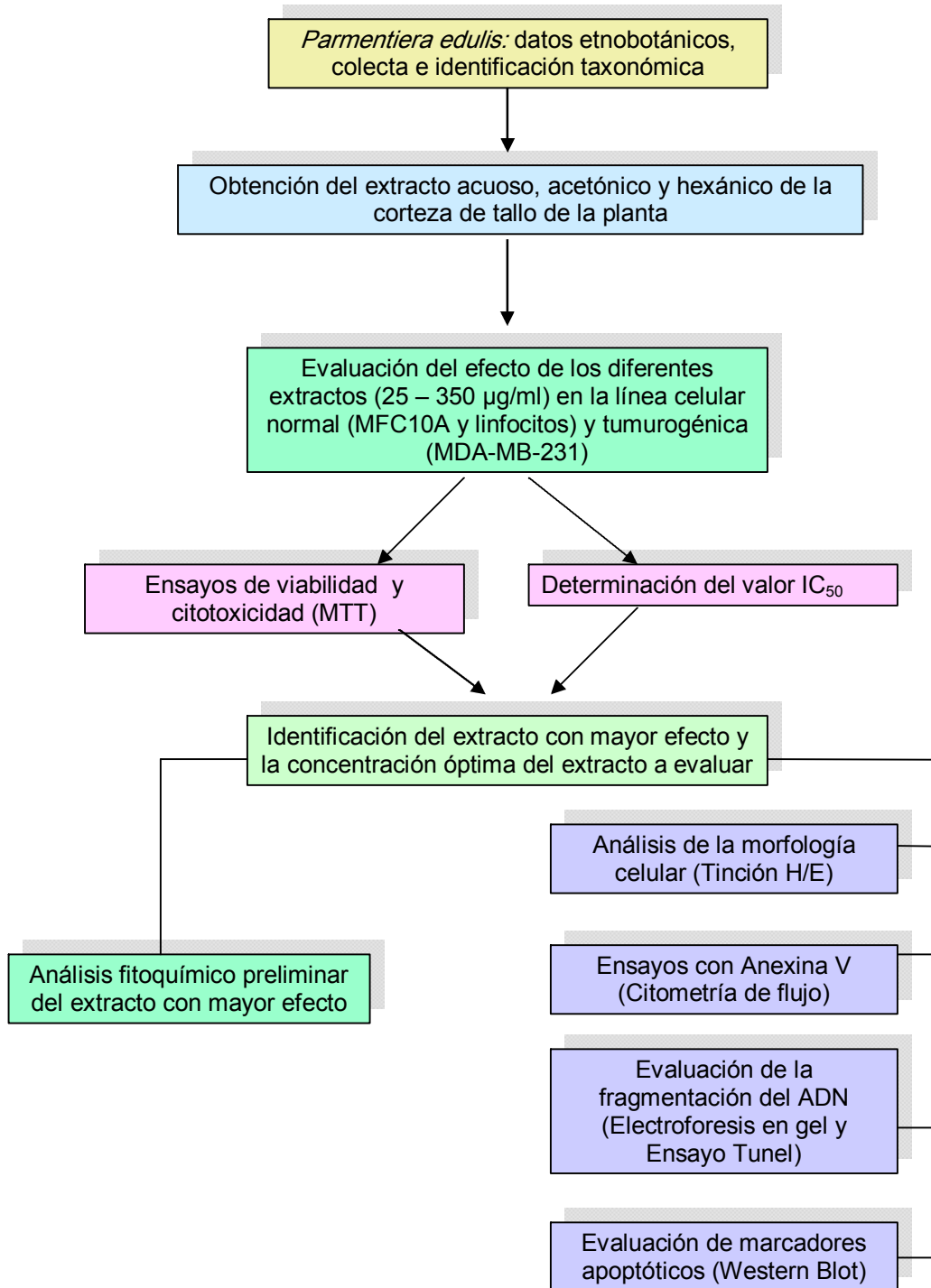


Figura 13. Diagrama general de la metodología.

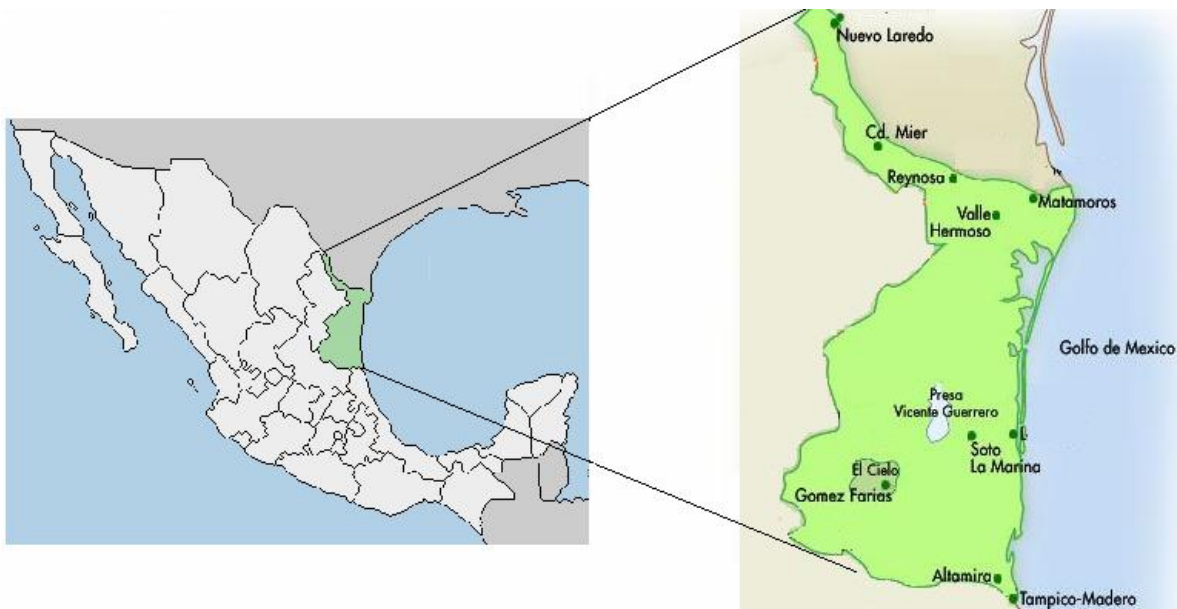
## 4.1 MATERIAL Y MÉTODOS

La Figura 13 muestra el diagrama general de la metodología empleada en esta investigación.

### 4.1 Obtención de información etnobotánica, colecta e identificación taxonómica de la planta

#### 4.1.1 Zona de Colecta

El municipio de Gómez Farías se localiza en la porción media del Estado de Tamaulipas, sobre la cuenca hidrológica del río Guayalejo. Colinda al norte con el municipio de Llera; al sur con el de Mante; al este con el de Xicoténcatl y al oeste con el de Ocampo. Su extensión territorial es de 432.57 kilómetros cuadrados, sus coordenadas son 22° 42'32" de latitud norte y los 0° 30'43" de longitud oeste, situado a una altitud de 350 metros sobre el nivel del mar (Figura 14). Existen diversos tipos de climas en este territorio. En la parte oriente, se considera semicálido, el más cálido de los templados. Su régimen de lluvias es en verano. En la parte este, el clima es semicálido, menos húmedo, con régimen de lluvias en verano. Gómez Farías tiene una temperatura oscilante, siendo de 7° C en invierno y de 34°C, la máxima en primavera y verano. Los vientos predominantes son los que soplan de sur a suroeste. La vegetación del municipio presenta diversas variaciones que van desde las coníferas en la Sierra Madre Oriental hasta las maderas del tipo tropical ([www.gomezfarías.gob.mx](http://www.gomezfarías.gob.mx)).



**Figura 14. Ubicación de la zona de colecta, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas**

(Modificado de [www.luventicus.org/cartes/mexique/tamaulipas.htm](http://www.luventicus.org/cartes/mexique/tamaulipas.htm)).

#### **4.1.2 Obtención de información etnobotánica**

Para la obtención de los datos etnobotánicos se realizó una entrevista al azar a la población del municipio de Gómez Farías, para conocer el uso que se le da a la planta en estudio. La información que se solicitó correspondió a los siguientes datos:

- a) Nombre común que se le da a la planta
- b) Parte de la planta que utilizan
- c) Padecimiento para el cual utilizan la planta
- d) Forma de preparación de la planta para su uso
- e) Cantidad que se utiliza de la planta
- f) Época de colecta o de uso de la planta

#### **4.1.3 Material biológico**

##### **4.1.3.1 Selección y recolecta de la planta**

Se colectaron alrededor de 7 Kg del tallo de la planta, y por separado se seleccionaron ejemplares libres de contaminantes y en buenas condiciones para su posterior identificación.

##### **4.1.3.2 Dsecación**

A los tallos se les separaron las cortezas y se extendieron sobre papel periódico, para secarlas a una temperatura de 26-28 °C por un periodo de una semana.

##### **4.1.3.3 Identificación taxonómica**

Para su identificación taxonómica se tomaron tres ejemplares, los cuales fueron limpiados, secados y montados en cartulina después de haber sido desecados. Estos ejemplares fueron llevados al Herbario Itza de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, y mediante claves botánicas especializadas se corroboró género y especie, además se le asignó un número de registro.

#### **4.2 Obtención de los extractos acuoso, acetónico y hexánico**

Una vez seco el material, la planta se pesó y empaquetó en bolsas de papel. Al final las bolsas se almacenaron en la oscuridad en cajones y a temperatura ambiente hasta su posterior uso. Para la obtención de los extractos se pesaron 25 g de muestra seca de la planta y se le agregaron 250 ml del solvente (agua, acetona o hexano) cada uno por separado. Los extractos se dejaron a temperatura ambiente por 5 días. Posteriormente se filtraron y el recuperado se concentró en un rotavapor (Yamato, Water bath BM 200) durante 12 a 18 h a 36°C hasta llevarlos a sequedad. Una vez concentrados se pesaron en alícuotas de 1 y 10 mg y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### 4.2.1 Identificación de las principales familias de componentes químicos presentes en los extractos

La separación e identificación de las principales familias de compuestos químicos se realizó mediante dos técnicas: Cromatografía en Capa Fina y ensayos colorimétricos.

##### 4.2.1.1 Cromatografía en Capa Fina

La Cromatografía en Capa Fina permite la separación e identificación de componentes químicos, por la diferente retención que experimentan los componentes, al ser más o menos adsorbidos por los componentes de una fase fija, cuando son arrastrados por un disolvente. Los compuestos que avanzan a lo largo de la placa se ven atraídos por fuerzas electrostáticas sobre la superficie del adsorbente, interaccionando el disolvente con ambos. Esta interacción competitiva establece las velocidades relativas con que ascienden por la capa de adsorbente, el frente de disolvente y un determinado compuesto. Cuanto mayor es la polaridad de los compuestos, más intensamente se ven éstos atraídos por el adsorbente (Domínguez, 1983).

##### 4.2.1.2 Estandarización de la Cromatografía en Capa Fina

Para la identificación de los principales metabolitos presentes en el extracto de la planta se estandarizó la fase móvil y la fase estacionaria. En la fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel y de albúmina. Mientras que en la fase móvil se hicieron varios sistemas con diferentes polaridades (Tabla 3). Esto para elegir el mejor sistema que separara los componentes selectivamente de acuerdo a su polaridad.

Tabla 3. Sistemas de la fase móvil.

Disolventes	Relación		
	8:2	5:5	2:8
Metanol/Acetato de etilo	+	+	+
Etanol/ Cloroformo	+	+	+
Etanol/ Hexano	+	+	+
Acetona/Acetato de etilo	+	+	+
Acetona/Hexano	+	+	+
Acetato de Etilo/Hexano	+	+	+
Cloroformo/Hexano	+	+	+

##### 4.2.3 Identificación de metabolitos por Cromatografía de Capa Fina

Para identificar las familias de compuestos químicos que se encuentran presentes en los extractos se cortaron placas de sílica gel de 1.0 x 5.0 cm. Posteriormente se tomó 1 mg del extracto



concentrado y seco, el cual se diluyó en 1 ml de solvente y con ayuda de un capilar se depositó 5 gotas sobre las placas de sílica y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego la placa se colocó en la fase móvil seleccionada para que la muestra ascendiera por capilaridad. Después de 1 a 2 min se sacaron las placas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a revelarlas.

Los reveladores utilizados fueron los siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Reveladores utilizados para la técnica de Cromatografía en Capa Fina.

Revelador	Familia de compuesto que identifica
Yodo	Ácidos grasos insaturados
Vainillina e hidróxido de potasio	Aminoácidos y aminas
Sulfato sérico y ácido sulfúrico	General
UV	Cromóforos
2, 4 dinitrofenilhidrazina	Aldehídos y cetonas
Dragendorff	Alcaloides
Cloruro férrico, ferrocianuro de potasio	Fenoles y esteroides fenólicos
Reactivo citrobórico	Flavonoides
Hidróxido potasio, etanol	Cumarinas volátiles
Revelador Liebermann-Buchard	Triterpenos y esteroides
Reacción Borntrager	Antracenos libres

Ver anexo para la preparación de los reveladores.

#### 4.2.1.4 Ensayos colorimétricos

Para realizar este tipo de ensayos, se pesaron 150 mg de cada uno de los extractos, a los cuales se les añadió 25 ml de etanol; esta mezcla se calentó a ebullición hasta llevarla a reflujo para concentrarse. Después, de cada mezcla se tomó una cantidad según lo indicado a la cual se le agregó un reactivo específico, considerando la prueba positiva cuando hubo la aparición de un precipitado o cambio de color (Tabla 5) (Domínguez, 1983).

Ver anexo para la preparación de los reveladores.

Tabla 5. Reveladores utilizados para los ensayos colorimétricos.

Revelador	Familia de compuesto que identifica
a) Fehling b) Benedict	Azúcares reductores
a) Baljet b) Piridina	Glucósidos cardiotónico
a) Shinoda	Flavonoides

b) NaOH	
a) Gelatina b) Cloruro férrico	Taninos
a) Hidróxido potasio/ etanol	Cumarinas
a) Dragendorff b) Wagner	Alcaloides
a) Liebermann-Buchard	Terpenos y esteroides
a) Hidroxilamina	Sesquiterpenlactonas
a) Espuma b) Liebermann-Buchard c) Rosenthaler	Saponinas
a) Borntrager	Quinonas

### 4.3 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular tumoral de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y la línea celular epitelial no tumorigénica MCF10A. Además de un cultivo primario de linfocitos obtenidos de sangre.

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. La línea celular tumoral MDA-MB-231 se cultivó en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen). Mientras que la línea MCF10A se cultivó en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino, además de EGF (100 mg/ml, Sigma), Insulina (100 mg/ml, Sigma) e Hidrocortisona (1 mg/ml, Sigma). El cultivo primario de linfocitos se mantuvo en medio RPMI y 10% de suero fetal bovino. La incubación se realizó en una incubadora a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y en condiciones de humedad constante (Debnath, *et al.* 2003).

### 4.4 Ensayos de Viabilidad

#### 4.4.1 Ensayo de MTT

Para evaluar la viabilidad inducida por el extracto se realizó la técnica colorimétrica MTT. El fundamento de esta técnica se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual es un compuesto de color amarillo) realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto denominado formazán (color azul), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. El anillo de tetrazolio es reducido en la mitocondria activa, así la reacción ocurre sólo en células vivas, ya que las células muertas son incapaces de reducir el MTT después de 30 min de lisis mediada por complemento. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, además de tener un valor para la medición rápida y cuantitativa de muerte celular (Loyola y Vázquez, 2006). La cantidad del formazán producido puede ser determinado

espectrofotométricamente una vez que el formazán es disuelto. El formazán producido se disuelve completamente en dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es el disolvente más apropiado para el ensayo, el compuesto colorido absorbe a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de células viables es directamente proporcional a dicha absorbancia, la cual es estable durante 2 h (León, *et al.* 2006).

#### **4.4.1.2 Procedimiento de la técnica MTT**

En este ensayo se evaluó el efecto de los extractos tanto en el cultivo primario de linfocitos, en la línea epitelial MCF10A, así como en la línea celular tumoral MDA-MB-231.

Las células se resuspendieron en medio fresco y se realizó una cuenta celular para sembrar 7000 células en cada pozo de una microplaca de 96 pozos y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con los controles y el problema. Como controles negativos se sembraron las células sin tratamiento y DMSO 0.2%; como control positivo se utilizó 0.25 µg/ml de Taxol y como problema se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos (25, 50, 100, 200, 350 y 500 µg/ml) a tiempos de 24, 48 y 72 h.

Al cabo de este tiempo se les adicionó el MTT (5 mg/ml, Sigma) y se dejó incubar por 4 h a 37°C en oscuridad. Una vez terminado el tiempo de incubación las placas se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 200 µl de DMSO y se realizó la lectura en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan Ms) a 570 nm y se calculó el % de viabilidad.

$$\% \text{ viabilidad} = \text{D. O. Problema} / \text{D. O. del testigo} \times 100$$

Posteriormente mediante el programa GraphPad Prims 5.0 se realizó una regresión no lineal entre el porcentaje de supervivencia y el *Log* de la concentración, para calcular el valor del IC<sub>50</sub>.

Al concluir estos ensayos se seleccionó el extracto que tuvo el mayor efecto al inhibir el crecimiento de las células tumorales, además de determinar la concentración óptima de éste.

### **4.5 Análisis del efecto del extracto en la morfología celular de la línea MDA-MB-231**

#### **4.5.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina**

Esta técnica se utiliza para la observación de la morfología celular, se basa en que los núcleos y otros componentes celulares basofílicos se tiñen de color morado a azul intenso con la hematoxilina, mientras que, el citoplasma se tiñe de rojo a rosa en presencia de la eosina (Stander, *et al.* 2009).

##### **4.5.1.1 Procedimiento.**

Para realizar la tinción, las células se sembraron en microplacas de 6 pozos y se dejaron incubar durante 24 h. Al cabo de este tiempo, las células fueron tratadas con el control positivo (Taxol 0.25

µg/ml), con los controles negativos (células sin tratamiento y con DMSO 0.2%) y con el extracto hexánico a una dosis de 94.63 µg/ml, a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Después del tratamiento, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y teñidas con la técnica de Hematoxilina y eosina. Para ello, las muestras fueron lavadas con PBS pH 7.4, luego teñidas con hematoxilina (4 min) y lavadas abundantemente con agua destilada, posteriormente se tiñeron con eosina (3 min) y luego las muestras se pasaron por un tren de deshidratación de alcoholes. Al finalizar las muestras se montaron en portaobjetos y se analizaron al microscopio de luz.

#### **4.5.2 Detección de Apoptosis con Anexina V-FITC**

Este ensayo se basa en que una vez iniciada la apoptosis, las células traslocan la fosfatidilserina desde la parte interna de la membrana plasmática hacia la parte externa de la membrana. Una vez en la superficie celular, la fosfatidilserina puede ser detectada al usar una proteína de alta afinidad como es la Anexina V. La detección puede realizarse mediante citometría de flujo o mediante microscopía de fluorescencia (Moreno, *et al.* 2000).

##### **4.5.2.1 Procedimiento**

Se sembraron las células a una densidad de  $5 \times 10^5$  en cajas de cultivo de 60 mm, durante 24 h antes del tratamiento. Posteriormente las células fueron tratadas, como controles negativos: células sin tratamiento y con DMSO 0.2%, el control positivo con Taxol 0.25 µg/ml y células tratadas con el extracto hexánico 94.63 µg/ml, cada uno de ellos a los tiempos de 6, 12, 24 y 48 h. Posterior al tratamiento, se colectaron las células y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Las células se resuspendieron en 500 µl de amortiguador de unión 1x y se adicionó 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de Yoduro de Propidio dejando a temperatura ambiente durante 5 min, para ello se utilizó el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Biovision). Posteriormente los resultados se analizaron por citometría de flujo (Citómetro FACScan, Beckton Dickinson)

#### **4.6 Determinación de la fragmentación del ADN**

La apoptosis puede ser evaluada al examinar el patrón característico de fragmentación del ADN generado en las células apoptóticas mediante electroforesis en gel y el ensayo de TUNEL (Gorczyca, *et al.* 1993).

##### **4.6.1 Electroforesis en gel de agarosa**

Se sembraron las células a una densidad de  $5 \times 10^5$  en cajas de cultivo de 60 mm y se dejaron durante 24 h antes del tratamiento. Posteriormente las células fueron tratadas, como controles negativos: células sin tratamiento y con DMSO 0.2%, como control positivo células con Taxol 0.25 µg/ml y como problema células tratadas con el extracto hexánico 94.63 µg/ml, cada uno de ellos a los tiempos de 12, 24 y 48 h. Posterior al tratamiento, se colectaron las células, al paquete celular se le adicionó una mezcla de EDTA 25 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.5%, Tris-HCl 200 mM,

proteinasas K 1mg/ml; y se incubó durante 1 h a 65° C. al cabo de este tiempo se realizó la extracción con la mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Luego se agregó RNasa (100mg/ml) y se realizó una extracción más con fenol:cloroformo. Para finalizar el ADN se precipitó con etanol absoluto a -20° C, se lava con OH al 70% y se resuspendió en 50 µl de agua. El ADN extraído se analizó en geles de agarosa al 2%, corridos durante 2 h a 50 V. Después el gel se tiñó con bromuro de etidio para poder visualizar el ADN en un transiluminador de luz UV.

#### **4.6.2 Ensayo de TUNEL**

Su fundamento nos indica que la enzima desoxinucleotidil-transferasa Terminal (TdT) cataliza la adición molde-independiente de nucleótidos modificados a los extremos 3' OH de ADN producto de la degradación nuclear y éstos pueden ser detectados por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (Gorczyca, *et al.* 1993).

##### **4.6.2.1 Procedimiento**

Se sembraron las células a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en cajas de cultivo de 60 mm, durante 24 h. Las células se trataron con el extracto hexánico 94.63 µg/ml, mientras que los controles negativos fueron administrados con DMSO 0.2% y células sin tratamiento y los controles positivos con Taxol 0.25 µg/ml y DNasa 3000 U/ml, cada uno de ellos a los tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Inmediatamente después del tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Al cabo de este tiempo las células se lavaron con 5 ml de PBS. Posteriormente las células se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 0.1% y citrato de sodio 0.1% durante 20 min y se lavaron con 5 ml de PBS. Luego se les agregó la solución 1 y 2 del kit (*In situ* Cell Death Detection Kit, AP, Roche) y se dejó incubar durante 60 min a 37°C. Posteriormente se llevó a cabo la observación de las células al microscopio de fluorescencia (Nikon diaphot 200) acoplado a un sistema de barrido láser confocal (MCRR 1024) (BioRad, California, EUA)

#### **4.7 Obtención de extractos proteicos, electroforesis en gel y análisis de la expresión de proteínas por Western Blot**

##### **4.7.1 Obtención de proteínas citoplasmáticas**

Las células se sembraron a una densidad  $1 \times 10^7$  en botellas de cultivo medianas y se incubaron por 24 h. Posteriormente se trataron con 93.64 µg/ml del extracto hexánico, los controles negativos se les administró DMSO al 0.2% y células sin tratamiento, mientras que el control positivo fue tratado con 0.25 µg/ml de Taxol, a los tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Después del periodo de tratamiento, las células fueron lisadas en el amortiguador de lisis: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol /L NaCl, 1 mmol /L EDTA, 5 % 2-mercaptoetanol, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % Na deoxicolato, 5 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 10 mg/ml de inhibidor de tripsina y 0.2 mmol /L fenilmetil-sulfonil fluorido (PMSF). Se homogenizó la mezcla y se agitó vigorosamente en el vortex por 30 s.

Luego se centrifugó a 14 000 rpm, durante 30 s a 4°C. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante, para determinar la concentración de las proteínas mediante el Método de Bradford usando un espectrofotómetro (Bekman DU<sup>R</sup> 650). Una vez determinada la concentración de las proteínas se realizó la separación electroforética en geles de poliacrilamida.

#### **4.7.2 Separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida**

Las proteínas de los extractos proteicos de las células MDA-MB-231 fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 18%; para lo cual los geles se prepararon de la siguiente manera: el gel concentrador (2.1 ml agua, 3.75 ml Tris 0.5 M pH 6.8, 100 µl SDS 10%, 9 ml acrilamida al 30%, 50 µl PSA 30%, 10 µl TEMED) y el gel separador (6.1 ml agua, 1.3 ml Tris 1.5 M pH 8.8, 100 µl SDS 10%, 1.3 ml acrilamida al 30%, 50 µl PSA 30 %, 10 µl TEMED). A 30 µg de las proteínas obtenidas se les agregó 2' β-mercaptoetanol al 5% y amortiguador de proteínas 2x (Tris-HCl 0.5 M, SDS 0.4 mg glicerol 2.0 ml, 2' β-mercaptoetanol 0.2 ml, azul de bromofenol 0.1 mg). Cada una de las muestras se colocó en tubos eppendorff y se hirvieron por 5 min a 100° C y se cargaron en cada pozo. Posteriormente se corrió el gel a 100 V durante 2 h. Las proteínas se visualizaron mediante la tinción con Azul de Coomassie.

Posteriormente se llevó a cabo la transferencia de las proteínas. Esta se realizó a 300 mA durante 2 h. Al término de la corrida se separó la membrana y se colocó en Rojo de Ponceau durante 5 min en agitación constante con la finalidad de verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con la solución bloqueadora (40 ml PBS 1X pH 7.4, 20 µl Tween 20, 2.0 g leche descremada) durante 24 h. Y luego se lavó dos veces con PBS pH 7.4-Tween 0.05% durante 10 min.

#### **4.7.3 Inmunodetección (Western Blot)**

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo las proteínas de las células MDA-MB-231 tratadas con las diferentes condiciones fueron incubadas con el primer anticuerpo: policlonal anti-caspasa 3 (1:25), anti-caspasa-8 (1:25) y anti-caspasa-9 (1:25) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluídos en PBS pH 7.4-Tween 0.05% (en 6 ml) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavaron tres veces con PBS pH 7.4-tween 0.05% durante 10 min y se les añadió el segundo anticuerpo (Anti-IgG peroxidado) diluido en PBS ph 7.4-tween 0.05%, a una dilución 1/2000, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavaron tres veces con PBS pH 7.4-Tween 0.05% durante 10 min. Posteriormente las membranas se trataron con el reactivo de detección ECL y se revelaron las placas. Al final se cuantificó la intensidad de banda y se calculó la expresión relativa de cada proteína.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de datos etnobotánicos, así como colecta e identificación taxonómica

Los datos etnobotánicos obtenidos en la zona de colecta correspondiente al municipio de Gómez Farías en el Estado de Tamaulipas indicaron información acerca de cómo las personas utilizan la planta: la preparación, forma de consumo y dosis, entre otros, los cuales se muestran en la Tabla 6

Tabla 6. Información etnobotánica de *P. edulis*.

<b>Nombre común</b>	Chote
<b>Hábitat</b>	Cálido subhúmedo Bosque tropical subcaducifolio
<b>Forma de consumo</b>	Oral
<b>Parte de la planta utilizada</b>	Corteza de tallo (siempre) o planta completa (poca frecuencia)
<b>Tiempo de colecta</b>	Todo el año
<b>Preparación para su uso medicinal</b>	Remojar toda la noche durante 24 h y beberlo constantemente
<b>Dosis para su uso medicinal</b>	Ingerir 2 veces al día o cada 8 h como mínimo
<b>Uso</b>	“Piedras o bultos” en los riñones y en el pecho

La colecta de la planta se llevó a cabo en el municipio antes mencionado en el mes de abril del 2009; en donde se recolectaron alrededor de 10 kg del tallo. De acuerdo con los usos tradicionales se colectó solo la corteza ya que se utiliza con mayor frecuencia. De éstas se seleccionaron ejemplares en buen estado para su identificación taxonómica en el Herbario Izta de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM a los cuales se les asignó el número de registro 1766. La identificación taxonómica fue realizada por la Biól. María Patricia Jáquez Ríos, quien clasificó a la planta perteneciente a la Familia Bignoniaceae y especie *Parmentiera edulis* D C (Figura 15).



Figura 15. Identificación taxonómica de *Parmentiera edulis* DC, con No. de registro 1766.



## 5.2 Obtención de los extractos de *P. edulis*

Una vez secó el material se obtuvieron los extractos, para ello, se pesaron 25 g de muestra y se le agregaron 250 ml de agua, acetona o hexano, dejando esta mezcla en reposo durante 5 días. En el caso del extracto acuoso, la mezcla se mantuvo en refrigeración para evitar su contaminación por el crecimiento de hongos y bacterias. Al cabo de este tiempo se filtró y colocó la muestra en un rotavapor para llevarlos a sequedad y así obtener los extractos a estudiar. El rendimiento obtenido para cada uno de los extractos se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos acuoso, acetónico y hexánico.

Extracto	Porcentaje de rendimiento
Acuoso	2.5 %
Acetónico	0.2 %
Hexánico	0.9 %

### 5.2.1 Identificación de las principales familias de componentes químicos presentes en los extractos acuoso, acetónico y hexánico de *P. edulis*

#### 5.2.2 Cromatografía en Capa Fina

##### 5.2.2.1 Estandarización del sistema para la separación e identificación de los metabolitos presentes en el extracto acuoso

Para la fase estacionaria se emplearon placas de sílica gel de 50 mm. Para la fase móvil se hicieron varios sistemas con diferentes polaridades (Tabla 8) y se eligió el que mejor separó los componentes del extracto.

Tabla 8. Sistemas de la fase móvil para la separación de metabolitos en el extracto acuoso.

Sistema de disolventes	Concentraciones		
	8:2	5:5	2:8
Agua /metanol	+	-	-
Agua /propanol	-	+	-
Agua /acetona	-	+	-
Agua/ acetato de etilo	-	-	-
Etanol /propanol	-	-	-
Acetona /acetato de etilo	-	-	-

+: Número de manchas observadas correspondientes a la presencia de compuestos químicos

Para el extracto acuoso se realizaron otros sistemas de disolventes conformados por tres compuestos, ya que con los sistemas anteriores no se observaron muchas manchas. Finalmente, la mezcla Agua/propanol/metanol fue la que mejor separó la muestra a una relación de 2:2:1 como se observa en la siguiente tabla (Tabla 9).

Tabla 9. Sistemas para la separación del extracto acuoso.

Sistema de disolventes	Relación	Número de manchas
Agua /propanol/ metanol	3:1:1	-
	1:3:1	++
	2:2:1	+++
	1.5:2.5:1	++
	0.5:4.5:0-5	--
	2:2.5:2.5	++

Para identificar las familias de compuestos químicos que forman parte del extracto acuoso se emplearon distintos reveladores (Tabla 12), además se calculó el valor de R<sub>f</sub>, el cual representa la posición de un compuesto sobre la placa como una fracción decimal ya que mide la retención de un componente y el cual se calcula con la siguiente fórmula.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida del compuesto desde el origen}}{\text{distancia total recorrida por la muestra}}$$

### 5.2.2.2 Estandarización de la técnica cromatográfica e identificación de los metabolitos en el extracto acetónico

Para la fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel de 50 mm; mientras que para la fase móvil se hicieron varios sistemas con diferentes polaridades (Tabla 10), con esto se eligió el sistema que separó más componentes de acuerdo a su polaridad.

Tabla 10. Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos en el extracto acetónico.

Disolventes	Relación		
	8:2	5:5	2:8
Metanol/acetato de etilo	-	-	-
Acetona/hexano	-	+	-
Acetona/acetato de etilo	-	-	-
Acetato de etilo/hexano	+++	+++	+

Acetato de etilo/tolueno	+++	++	-
Cloroformo/hexano	+	+	+
Etanol/cloroformo	-	-	-
Etanol/hexano	-	-	-

+: Número de manchas observadas correspondientes a la presencia de compuestos químicos

De estas fases se seleccionó el sistema Acetato de etilo/hexano y se realizaron las siguientes diluciones:

Sistema de disolvente	9.5:0.5	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
Acetato de etilo/hexano	+++++	++++	++++	+++	++	+

Por lo que la fase seleccionada fue acetato de etilo/hexano a una relación de 9.5:0.5

Para identificar las familias de compuestos químicos que forman parte del extracto acetónico se realizaron ensayos empleando reveladores específicos (Tabla 12) y se calculó el valor R<sub>f</sub> como se mencionó anteriormente.

### 5.2.2.3 Estandarización del sistema para la separación e identificación de los metabolitos presentes en el extracto hexánico

Para la fase estacionaria se emplearon nuevamente placas de sílica gel de 50 mm. Para la fase móvil se hicieron varios sistemas con diferentes polaridades (Tabla 11) y se eligió el que separó mejor los componentes del extracto.

Tabla 11. Sistemas de la fase móvil para la separación de metabolitos en el extracto hexánico.

Sistema de disolventes	Relación		
	8:2	5:5	2:8
Hexano/ acetato etilo	+++	-	-
Hexano/acetona	-	+	-
Hexano/cloroformo	++	+++	+++++
Hexano/etanol	++	++	++
Etanol/ cloroformo	++	-	-
Tolueno/acetato de etilo	+++	-	-
Tolueno/cloroformo	+++	+++	+++
Tolueno/acetona	-	-	-

+: Número de manchas correspondientes a la presencia de compuestos químicos.



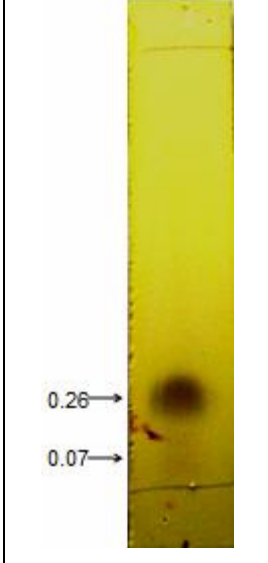

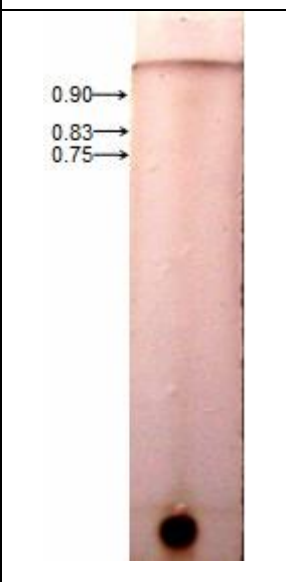
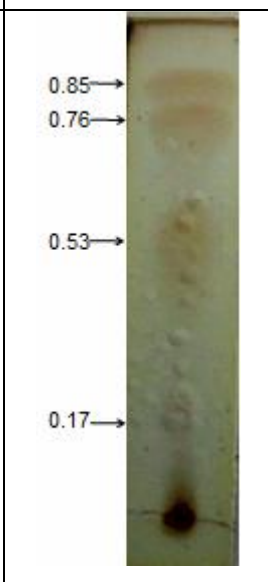
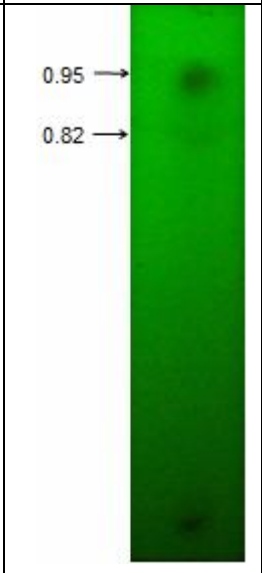
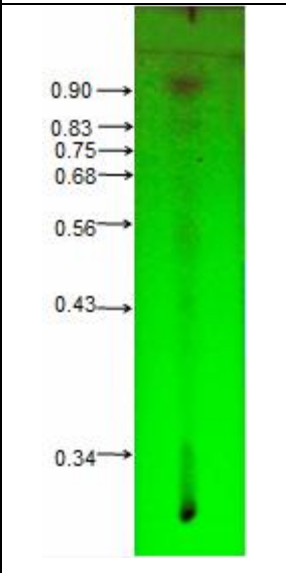
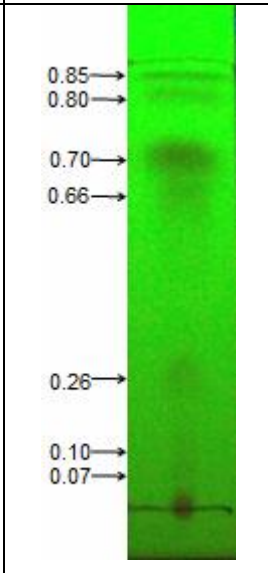
De estas fases se seleccionó el sistema Hexano/cloroformo y se realizaron las siguientes diluciones:










Sistema de disolvente	9.9:0.1	9.8:0.2	9.5:0.5	9:1	8:2
Hexano/Cloroformo	+++++	++++	++++	++++	++++










Debido a estos resultados, se seleccionó la relación de 9.9:0.1 para realizar las cromatografías, ya que en esta fase se observó un mayor número de manchas. Para identificar las familias de compuestos químicos que forman parte del extracto hexánico se emplearon distintos reveladores (Tabla 12), además de calcular el valor Rf como se mencionó anteriormente.






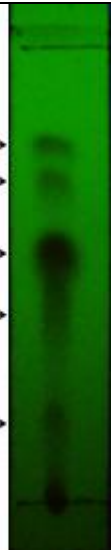
Tabla 12. Revelamiento fitoquímico del extracto acuoso, acetónico y hexánico.

Revelador	Compuesto que identifica	Placas cromatográficas		
		Extracto acuoso	Extracto acetónico	Extracto hexánico
Yodo	Compuestos generales	<p>0.95 → 0.82 → 0.05 →</p>	<p>0.90 → 0.83 → 0.73 → 0.61 →</p>	<p>0.85 → 0.78 → 0.55 →</p>

<p>Vainillina e hidróxido de potasio</p>	<p>Aminoácidos y aminas</p>	 <p>0.95 →</p>		 <p>0.26 →</p> <p>0.07 →</p>
<p>Sulfato sérico y ácido sulfúrico</p>	<p>General</p>	 <p>0.95 →</p> <p>0.90 →</p> <p>0.82 →</p>	 <p>0.90 →</p> <p>0.83 →</p> <p>0.75 →</p>	 <p>0.85 →</p> <p>0.76 →</p> <p>0.53 →</p> <p>0.17 →</p>
<p>UV</p>	<p>General</p>	 <p>0.95 →</p> <p>0.82 →</p>	 <p>0.90 →</p> <p>0.83 →</p> <p>0.75 →</p> <p>0.68 →</p> <p>0.56 →</p> <p>0.43 →</p> <p>0.34 →</p>	 <p>0.85 →</p> <p>0.80 →</p> <p>0.70 →</p> <p>0.66 →</p> <p>0.26 →</p> <p>0.10 →</p> <p>0.07 →</p>

<p>2, 4 dinitro fenil hidrazina</p>	<p>Aldehídos y cetonas (flavonoides)</p>	 <p>0.95 → 0.82 →</p>	 <p>0.90 → 0.83 → 0.73 →</p>	 <p>0.17 →</p>
<p>Cloruro férico, ferrocianuro de potasio</p>	<p>Fenoles y esteroides fenólicos</p>	 <p>0.95 → 0.82 →</p>		 <p>0.84 → 0.76 →</p>
<p>Reactivo citrobórico</p>	<p>Flavonoides</p>		 <p>0.90 → 0.83 → 0.75 → 0.56 →</p>	 <p>0.85 → 0.80 → 0.65 →</p>

Dragendorff	Alcaloides			
Hidróxido Potasio, etanol	Cumarinas volátiles	 <p>0.95 →</p>	 <p>0.40 →</p>	 <p>0.85 → 0.80 →</p>
Revelador Liebermann-Buchard	Triterpenos	 <p>0.95 → 0.90 →</p>	 <p>0.90 → 0.83 → 0.73 →</p>	 <p>0.65 → 0.27 →</p>

Vainillina /ácido sulfúrico	Saponinas			
Reactivo de Borntrager	Antracenos libres			

En la tabla 13 se muestra un resumen de los metabolitos presentes en cada uno de los extractos con la técnica de CCF. Como podemos observar, en los tres extractos obtenidos están presentes familias de compuestos similares, sin embargo con estos ensayos no se puede determinar si se refieren a los mismo metabolitos o son diferentes miembros de estas familias. Asimismo, observamos que en el extracto acuoso no se detectaron saponinas, terpenos y quinonas, en el extracto acetónico no se detectaron alcaloides sin embargo este extracto mostró una mayor cantidad de diferentes metabolitos, mientras que en el extracto hexánico no hubo presencia de flavonoides, saponinas y alcaloides.



Tabla 13. Metabolitos presentes en el extracto acuoso, acetónico y hexánico con la técnica CCF.

Extracto acuoso	Extracto acetónico	Extracto hexánico
Aminoácidos		Aminoácidos
Cromóforos	Cromóforos	Cromóforos
Aldehídos y cetonas	Aldehídos y cetonas	Aldehídos y cetonas
Cumarinas	Flavonoides	
Terpenos	Cumarinas	Cumarinas
	Terpenos	Terpenos
	Saponinas	
	Antracenos libres (quinonas)	Antracenos libres (quinonas)

### 5.2.3 Ensayos fitoquímicos colorimétricos

Para estos ensayos se utilizaron reactivos específicos para la identificación de familias de compuestos químicos (Tabla 14). Estas pruebas se realizaron para corroborar lo obtenido en los ensayos de CCF. Los resultados mostraron que el extracto acuoso es el que presenta un menor número de compuestos, mientras que los extractos acetónico y hexánico presentaron cuatro y tres familias de compuestos respectivamente; algunos de los cuales como las cumarinas y terpenos que también fueron identificados con la técnica de CCF.

Tabla 14. Análisis fitoquímico colorimétrico de los diferentes extractos.

Compuesto que identifica	Reactivo utilizado	Extracto acuoso	Extracto acetónico	Extracto hexánico
Azúcares reductores	a) Fehling	-	-	-
	b) Benedict			
Glucósidos cardiotónicos	a) Baljet	-	-	-
	b) Piridina			
Flavonoides	a) Shinoda	-	+	-
	b) NaOH			
Taninos	a) Gelatina	-	-	-
	b) Cloruro férrico			
Cumarinas	a) Hidróxido potasio/ etanol	+	+	+

<b>Alcaloides</b>	a) Dragendorff	-	-	-
	b) Wagner			
<b>Terpenos y esteroides</b>	a) Liebermann-Buchard	-	+	+
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	a) Hidroxilamina	-	-	-
<b>Saponinas</b>	a) Espuma	-	-	-
	b) Liebermann-Buchard			
	c) Rosenthaler			
<b>Quinonas</b>	a) Borntrager	-	+	+

En resumen en la tabla 15 se muestran los metabolitos presentes en cada uno de los extractos evaluados con ambas técnicas: CCF y pruebas colorimétricas.

Tabla 15. Metabolitos presentes en los diferentes extractos analizados con CCF y pruebas colorimétricas.

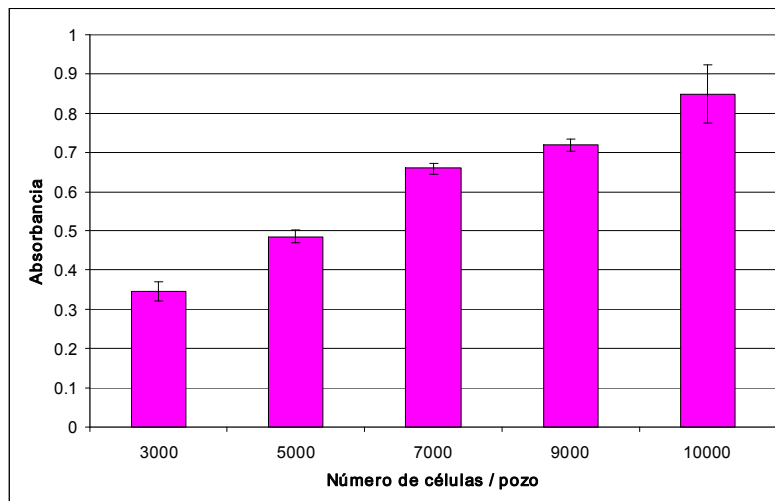
<b>Extracto acuoso</b>	<b>Extracto acetónico</b>	<b>Extracto hexánico</b>
Cumarinas	Flavonoides Cumarinas Terpenos Antracenos libres (quinonas)	Cumarinas Terpenos Antracenos libres (quinonas)

### 5.3 Ensayos de viabilidad y citotoxicidad

#### 5.3.1 Estandarización de la técnica

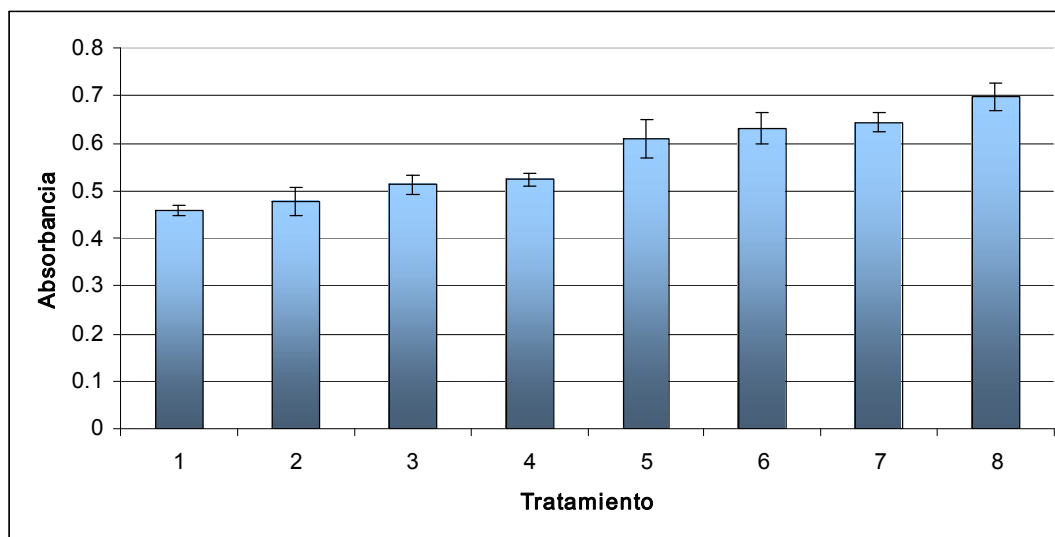
Para evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 se llevó a cabo la técnica con MTT. Para ello primero se estandarizó el número de células a incubar en las microplacas de 96 pozos, así como la concentración de MTT y el disolvente del formazan, para realizar los experimentos.

Para la estandarización del número de células a utilizar se sembraron diferentes densidades de éstas que fueron desde 3000 hasta 10,000, esto con base a la bibliografía consultada, en donde se ha reportado este número de células obteniendo absorbancias en el rango de 0.5 a 2.0 (Mossman, 1983). Los resultados mostraron un incremento en la absorbancia directamente proporcional con el incremento en el número de células (Figura 16). Sin embargo, al sembrar 3000 y 5000 células la absorbancia detectada fue menor a 0.5 por lo cual estas dos cantidades de células se descartaron.



**Figura 16. Estandarización del número de células para el ensayo con MTT.**

Por otra parte a un mayor número de células de 7000 a 10,000, la absorbancia estuvo dentro del rango de 0.5–2.0, valores óptimos de acuerdo a lo reportado en la literatura para estos ensayos. Por lo cual de acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó trabajar con 7000 células, ya que se obtuvo una absorbancia de 0.659, asimismo es importante no sembrar un número de células muy alto ya que pueden morir debido a un incremento rápido en su tasa de crecimiento y no al efecto del extracto.



**Figura 17. Estandarización del tipo de disolvente y cantidad de MTT para los ensayos de viabilidad.** Columna 1: isopropanol 100  $\mu$ l, MTT 1 mg/ml; 2: isopropanol 100  $\mu$ l, MTT 5 mg/ml; 3: isopropanol 200  $\mu$ l, MTT 1 mg/ml; 4: isopropanol 200  $\mu$ l, MTT 5 mg/ml; 5: DMSO 100  $\mu$ l, MTT 1 mg/ml; 6: DMSO 100  $\mu$ l, MTT 5 mg/ml; 7: DMSO 200  $\mu$ l, MTT 1 mg/ml y 8: DMSO 200  $\mu$ l, MTT 5 mg/ml

Otras variables que se estandarizaron fueron la concentración de MTT en donde se utilizaron concentraciones de 1 mg/ml y 5 mg/ml, y el disolvente para el formazan, donde se utilizó isopropanol y DMSO a 100 y 200  $\mu$ l. De estas variables se seleccionó 5 mg/ml de MTT, así como 200  $\mu$ l de DMSO ya que con estas condiciones se obtuvieron mejores absorbancias (Figura 17).

Una vez estandarizadas las condiciones para el experimento, se evaluó el efecto de cada uno de los extractos sobre la línea tumoral MDA-MB-231.

### 5.3.2 Evaluación del extracto acuoso sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231

Se evaluó el efecto del extracto acuoso en la línea celular tumoral, el extracto se probó a distintas concentraciones y a tiempos de 24, 48 y 72 h. Cada ensayo se realizó por triplicado, los porcentajes obtenidos fueron promediados y graficados con su desviación estándar. En la tabla 16 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos para el tratamiento así como su correspondiente gráfica (Figura 18).

Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto acuoso.

Tiempo (h)	Células sin Tx	Células con DMSO al 0.2%	Células con Taxol 0.25 $\mu$ g/ml	Concentración del extracto ( $\mu$ g/ml)					
				25	50	100	200	250	350
24	100	96.16	84.2898	99.86	92.17	95.29	96.19	99.45	100.70
48	100	101	58.39	93.45	99.93	96.66	94.91	96.812	98.15
72	100	97.13	35.25	94.76	105.06	97.24	97.13	99.47	94.2

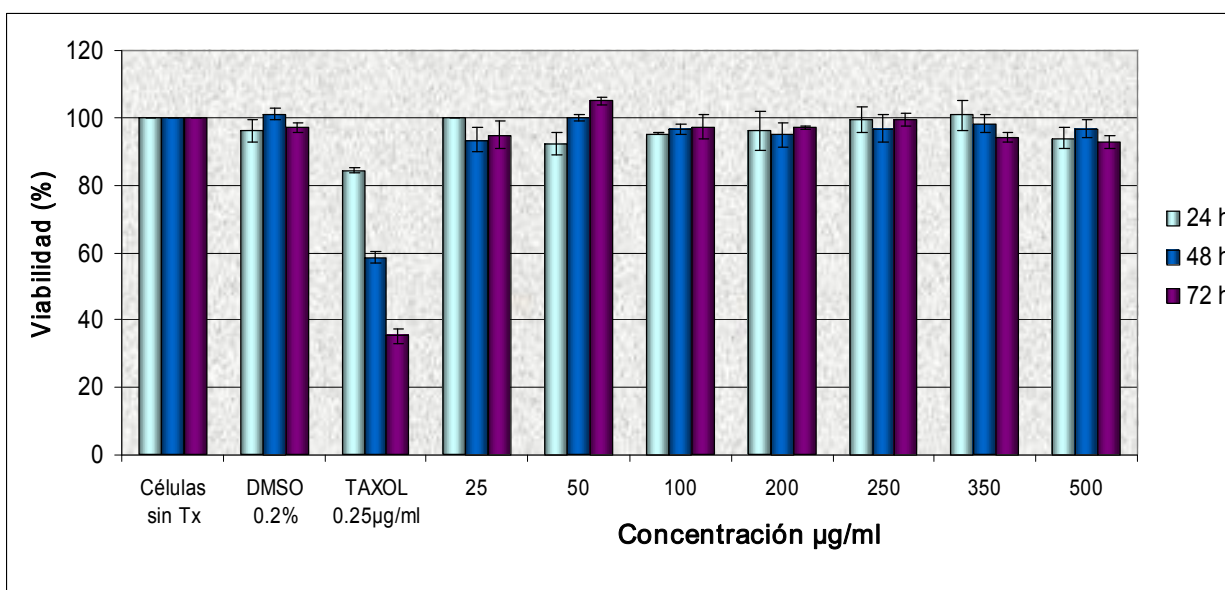


Figura 18. Efecto del extracto acuoso en la línea tumoral MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de viabilidad de las células sin tratamiento es del 100% y no se observa una diferencia significativa con las células tratadas con DMSO 0.2%. Esto es importante ya que para disolver cada uno de los extractos, se utilizó como disolvente el DMSO, la concentración a la cual se utilizó el DMSO en todos los ensayos es la adecuada y no afecta la viabilidad de las células tumorales. En el caso del control positivo utilizando Taxol, la viabilidad disminuyó hasta un 35% a las 72 h, no obstante, ésta disminución fue dependiente del tiempo de exposición, tal y como ha sido reportada en otros sistemas (Soo-Jung, *et al.* 2004)

En el caso de las células tratadas con el extracto acuoso, se observó que la viabilidad permanece constante al utilizar dosis desde 25 hasta 500 µg/ml, semejante a los controles negativos. Esto nos indica que el extracto acuoso no tuvo ningún efecto sobre las células tumorales.

### 5.3.3 Evaluación del extracto acetónico sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231.

Asimismo, se evaluó el efecto del extracto acetónico a diferentes concentraciones y tiempos, sobre la viabilidad de la línea celular tumoral MDA-MB-231. En la tabla 17 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos para el tratamiento, así como su gráfica correspondiente (Figura 19).

Tabla 17. Porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto acetónico.

Tiempo (h)	Células sin Tx	Células con DMSO al 0.2%	Células con Acetona 0.2%	Células con Taxol 0.25 µg/ml	Concentración del extracto (µg/ml)					
					25	50	100	200	250	350
24	100	99.96	99.72	84.28	99.75	99	87	90.6	90.5	84
48	100	101	101.8	58.39	95.57	97.05	90.24	82.03	81.55	76.42
72	100	98.5	97.13	35.25	91.81	94.56	83.23	84.36	75.76	74

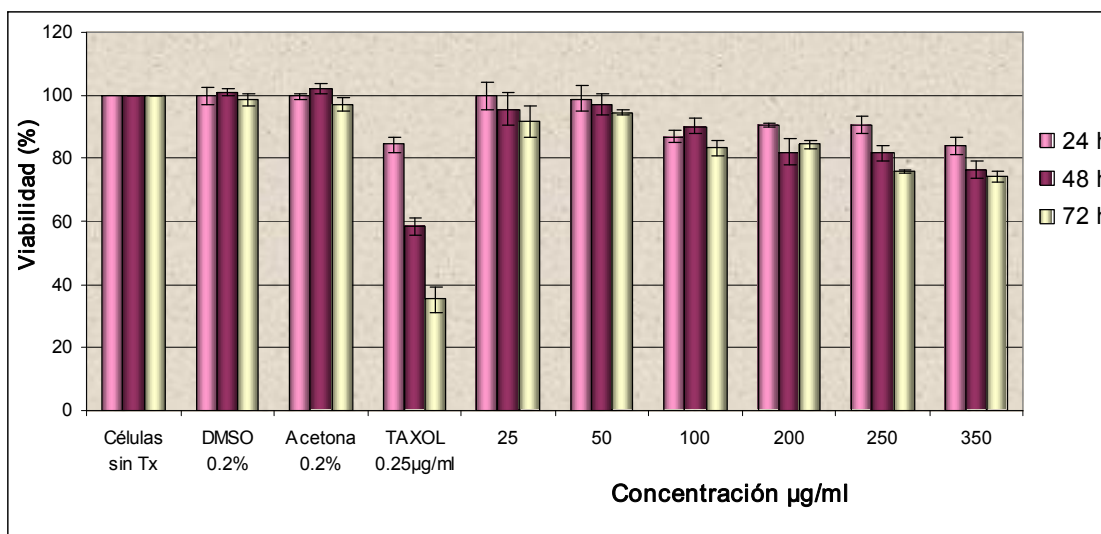


Figura 19. Efecto del extracto acetónico en la línea tumoral MDA-MB-231.

En los resultados obtenidos se observa a las células sin tratamiento con una viabilidad del 100%, así como aquellas que fueron tratadas con DMSO y acetona al 0.2%. Esto nos indica que tanto el DMSO, como la acetona que fue el disolvente utilizado para obtener este extracto no están afectando la viabilidad de ésta línea celular. Por el contrario, observamos con el control positivo que cuando las células son tratadas con Taxol, la viabilidad va disminuyendo conforme se incrementa el tiempo de tratamiento.

En el caso de las células tratadas con el extracto acetónico, se observó que la viabilidad de las células tumorales disminuyó en forma dosis dependiente, es decir, con dosis bajas de 25 y 50 µg/ml la viabilidad permanece semejante a la de los controles negativos durante los tres tiempos de tratamiento, al utilizar 100 o 200 µg/ml la viabilidad disminuyó de un 10 a un 18%; mientras que cuando se utilizaron dosis altas de 250 y 350 µg/ml se observó una disminución de la viabilidad celular máxima del 26% a un tiempo de exposición de 72 h.

Esto nos indica que el extracto acetónico tuvo un efecto sobre la viabilidad de las células tumorales a concentraciones altas, el cual es dosis y tiempo dependiente.

#### 5.3.4 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231.

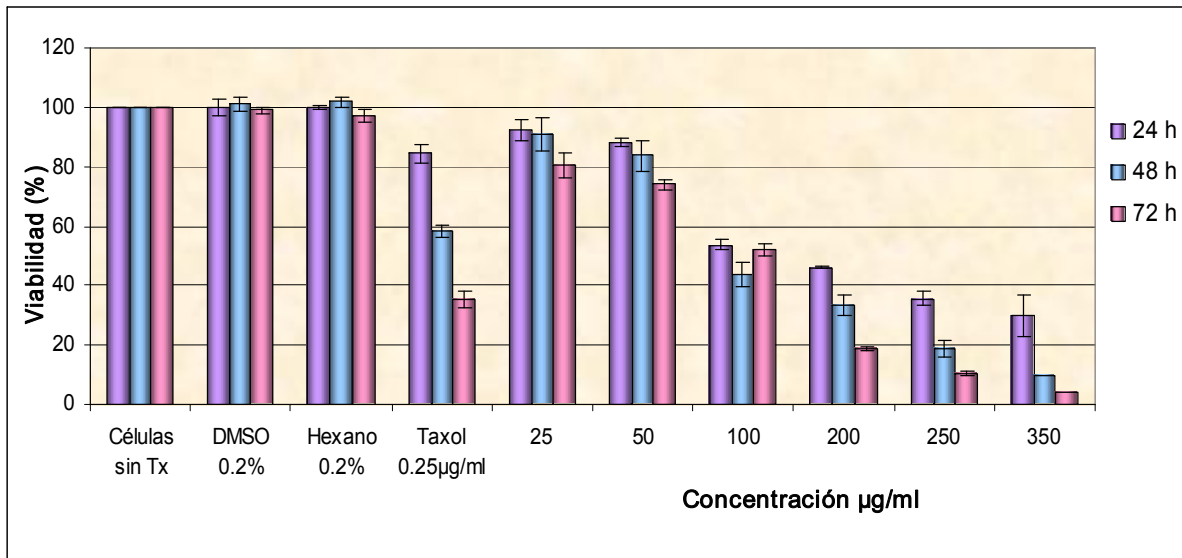
Finalmente, se evaluó el efecto del extracto hexánico sobre la viabilidad de las células tumorales, utilizando diferentes concentraciones y tiempos de exposición; en la tabla 18 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos para el tratamiento así como su correspondiente gráfica (Figura 20).

Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto hexánico.

Tiempo (h)	Células sin Tx	Células con DMSO al 0.2%	Células Con Hexano 0.2%	Células con Taxol 0.25 µg/ml	Concentración del extracto (µg/ml)					
					25	50	100	200	250	350
24	100	99.96	99.72	84.28	92.2	87.98	53.67	45.89	35.63	30
48	100	101	101.8	58.39	90.99	83.77	43.58	33.4	18.73	9.96
72	100	98.9	97.13	35.25	80.45	74.05	51.94	18.7	10.53	3.85

Los resultados de estos ensayos nos indican que tanto las células sin tratamiento como aquellas tratadas con DMSO y hexano al 0.2% poseen una viabilidad del 100%, por lo que el disolvente utilizado para hacer el extracto y el DMSO no tuvieron ningún efecto en las células tumorales.

En el caso de las células que fueron tratadas con Taxol, observamos nuevamente que la viabilidad fue disminuyendo conforme se incrementó el tiempo de tratamiento.



**Figura 20. Efecto del extracto hexánico en la línea tumoral MDA-MB-231.**

Interesantemente, las células tratadas con el extracto hexánico, presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular, a diferencia del efecto que tuvieron los otros extractos evaluados. Este efecto se observó desde una dosis de 25 µg/ml, en donde se obtuvo un porcentaje de viabilidad de las células del 92% a las 24 h y de 80% a las 72 h. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con una dosis de 100 µg/ml, la viabilidad disminuyó hasta un 53% a las 24 h y cuando las células fueron expuestas a una dosis de 350 µg/ml la viabilidad disminuyó hasta un 30% a las 24 h y hasta un 3% a las 72 h. Estos resultados nos muestran que el extracto está ejerciendo un efecto letal sobre la línea celular MDA-MB-231 de forma dosis y tiempo dependiente.

Por lo tanto, de los extractos analizados, el extracto hexánico es el que presentó un mayor efecto sobre la viabilidad de las células tumorales, razón por la cual los siguientes experimentos fueron realizados con este extracto.

#### **5.3.4 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad del cultivo primario de linfocitos**

Posteriormente, con la finalidad de demostrar que el extracto hexánico elimina específicamente a las células tumorales MDA-MB-231 y no a las células normales, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando un cultivo primario de linfocitos obtenidos de sangre periférica de humanos. En este caso también se probaron diferentes concentraciones del extracto hexánico a los mismos tiempos de exposición. En la tabla 19 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos del tratamiento con el extracto hexánico así como su correspondiente gráfica (Figura 21).

Tabla 19. Porcentaje de viabilidad de linfocitos tratados con el extracto hexánico.

Tiempo (h)	Células sin Tx	Células con DMSO al 0.2%	Células con Hexano 0.2%	Células con Taxol 0.25 µg/ml	Concentración del extracto (µg/ml)							
					25	50	100	200	250	350	500	1000
24	100	95.45	97.8	78.66	96.75	95.88	93.67	93.35	89.86	79.43	66.88	46.56
48	100	99.48	97.94	75.77	95.91	92.24	92.45	92.11	85.58	78	69.19	43.77
72	100	98.63	97.64	72.18	94.78	93.63	94.94	91.67	86.24	76.7	65.36	41.89

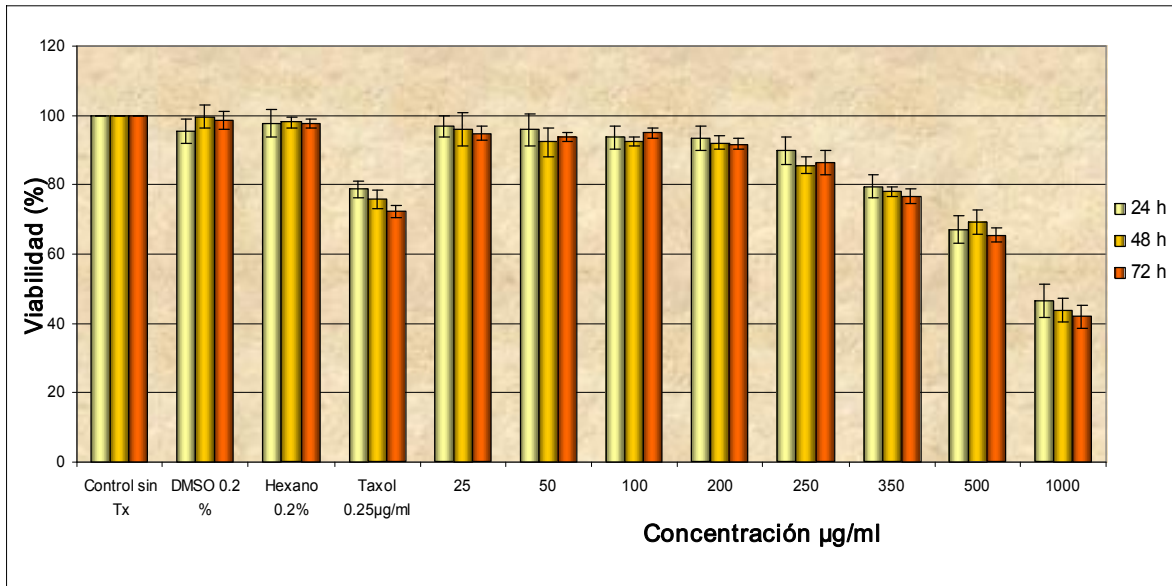


Figura 21. Efecto del extracto hexánico en el cultivo primario de linfocitos.

Los resultados mostraron que tanto las células sin tratamiento como aquellas tratadas con DMSO y hexano al 0.2% poseen una viabilidad del 100%, a diferencia, de las células tratadas con Taxol cuya viabilidad disminuyó hasta un 28% después de transcurridas 72 h de exposición al fármaco. En el caso del tratamiento con el extracto hexánico se observó que la viabilidad presentada por los linfocitos estaba por arriba del 85% a las concentraciones de 25 a 250 µg/ml en los tiempos analizados. Sin embargo cuando se aplicaron dosis altas de 1000 µg/ml, la viabilidad disminuyó hasta en un 42%.

Estos resultados nos indican que el extracto hexánico tiene un efecto sobre la viabilidad de las células tumorales, particularmente a una concentración de 100 µg/ml más no así en el cultivo primario de linfocitos (células no tumorales), en donde el efecto se observó a dosis muy elevadas de 1000 µg/ml.



### 5.3.6 Evaluación del extracto hexánico sobre la viabilidad de la línea celular MCF10A

Asimismo, para demostrar que el extracto hexánico elimina específicamente a las células tumorales de la línea MDA-MB-231, se analizó el efecto del extracto en la línea celular epitelial no tumorigénica MCF10A. Para realizar este análisis se utilizaron diferentes concentraciones del extracto hexánico a tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h; así como los controles positivo y negativo correspondientes. En la tabla 20 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos del tratamiento con el extracto hexánico, así como su correspondiente gráfica (Figura 22).

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF10A, tratada con el extracto hexánico.

Tiempo (h)	Células sin Tx	Células con DMSO al 0.2%	Células con Hexano 0.2%	Células con Taxol 0.25 µg/ml	Concentración del extracto (µg/ml)						
					25	50	100	200	350	500	1000
24	100	96.79	99.56	84.89	104.7	109.6	106.3	99.23	86.53	77.98	46.60
48	100	106.69	104.6	83.68	110.3	109.2	105.7	104.2	79.77	68.1	34.16
72	100	103.56	99.38	69.03	101.3	106.1	100.7	92.78	70.1	64.96	31.2

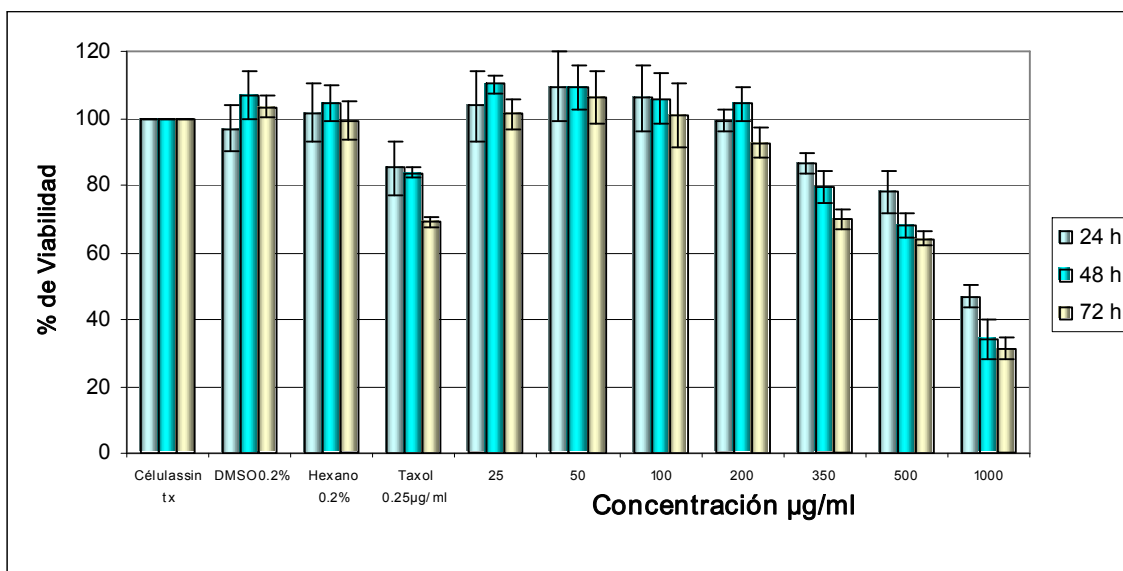


Figura 22. Efecto del extracto hexánico en la línea celular MCF10A.

Los resultados mostraron que tanto las células sin tratamiento, como aquellas tratadas con DMSO 0.2% y hexano al 0.2%, mantienen una viabilidad celular alrededor del 100% en todos los tiempos de tratamiento. En contraste, se observó que en las células tratadas con Taxol 0.25 µg/ml, a tiempos de 24 y 48 h la viabilidad disminuyó un 25%, mientras que a las 72 h de tratamiento la viabilidad disminuyó en un 30%. En el caso de las células MCF10A expuestas al extracto hexánico, se observó un efecto semejante al tratamiento con linfocitos; ya que a dosis bajas de 25 a 200

$\mu\text{g/ml}$ , la viabilidad se mantuvo igual que los controles negativos, con un porcentaje aproximado del 100% de viabilidad. Sin embargo se observó que a dosis de 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  la viabilidad disminuyó hasta un 35 y 69 % respectivamente.

Estos resultados reiteran que el extracto hexánico tiene un efecto citotóxico mayor sobre la viabilidad de las células tumorales, a diferencia de las células normales utilizadas como fueron los linfocitos y las células epiteliales de mama de la línea MCF10A.

### 5.3.7 Obtención del $\text{IC}_{50}$ del extracto hexánico

Una vez que se evaluó el efecto del extracto hexánico sobre la viabilidad de células normales como los linfocitos, se calculó el  $\text{IC}_{50}$ , esto para obtener la concentración óptima que disminuye la viabilidad al 50% en las células tumorales. Para realizar esto se utilizó el programa Graph Pad Prims 5.0, el cual mediante una regresión no lineal, grafica el *log* de la concentración vs el porcentaje de viabilidad (Figura 23).

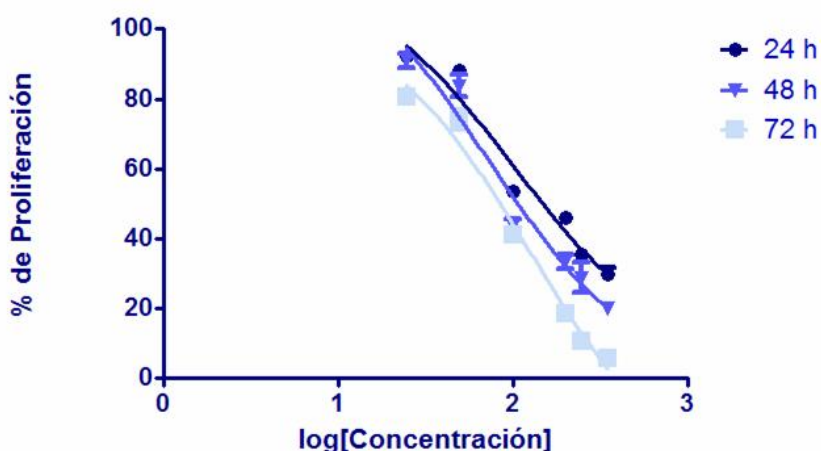


Figura 23. Cálculo del  $\text{IC}_{50}$  del extracto hexánico sobre la línea celular MDA-MB-231.

El programa nos indicó que el valor  $\text{IC}_{50}$  del extracto hexánico es de  $94.63 \pm 1.63 \mu\text{g/ml}$ , lo cual concuerda con los resultados mostrados en la Figura 20. Debido a estos resultados y con el valor obtenido del  $\text{IC}_{50}$ , se realizaron los siguientes experimentos, evaluando únicamente el extracto hexánico.

## 5.4 Efecto del extracto hexánico sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231

### 5.4.1 Tinción con Hematoxilina y eosina

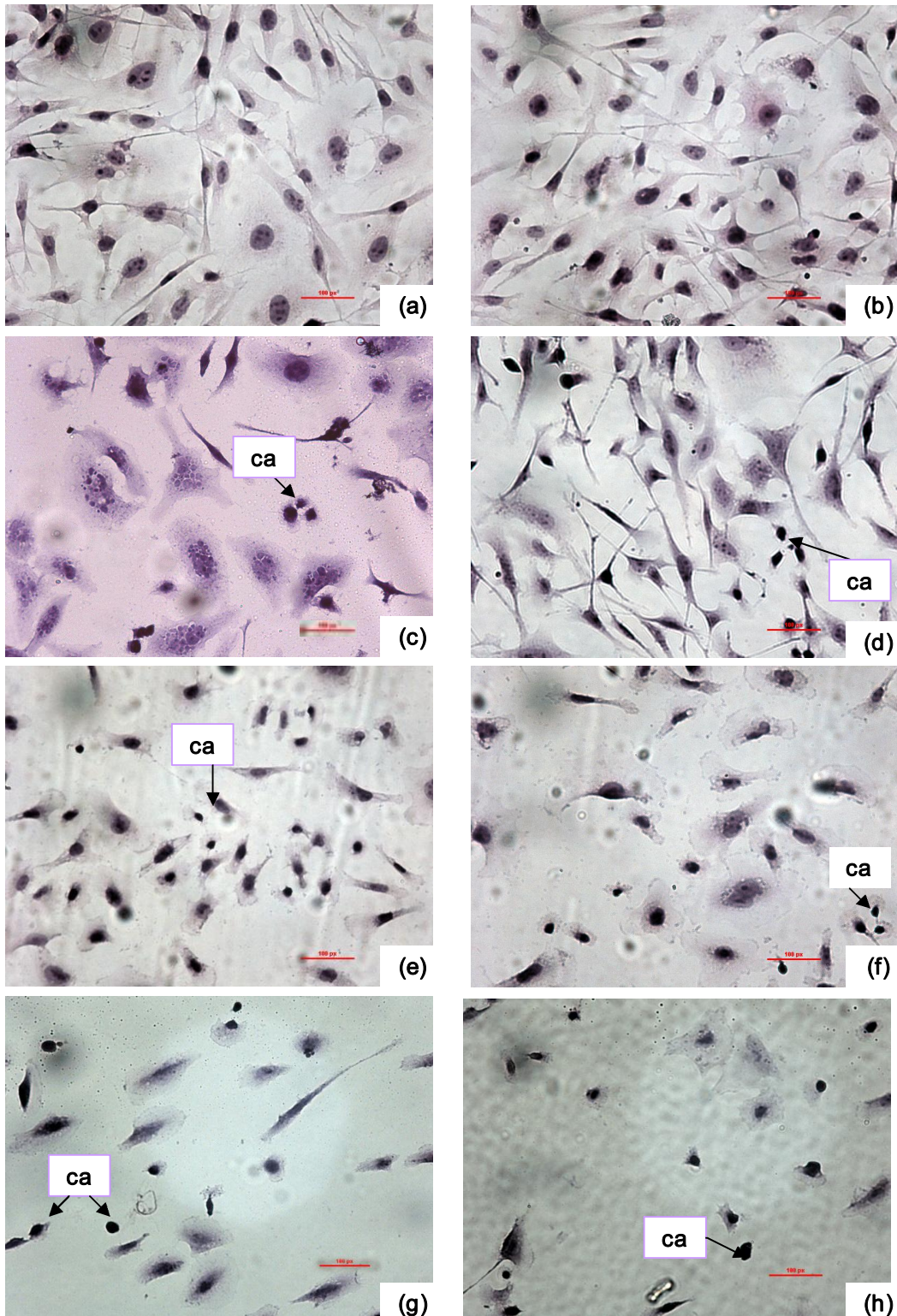
Una célula que inicia un evento de muerte celular, puede activar toda una cascada de eventos celulares y moleculares que culminan en su desintegración. Una de las primeras evidencias de

este evento de muerte son los cambios morfológicos que puede presentar la célula y que pueden ser evidenciados por diferentes tipos de microscopías. Ahora bien, debido a que en los resultados anteriores se demostró que el extracto hexánico presentó un efecto citotóxico sobre la línea celular MDA-MB-231, se procedió a observar cambios en la morfología celular. Para ello, las células fueron expuestas al extracto hexánico (94.63 µg/ml), asimismo se colocaron los respectivos controles positivos (células sin tx y con DMSO 0.2%) y negativo (Taxol 0.25 µg/ml) y posteriormente se realizó la tinción con la técnica de hematoxilina y eosina. Una de las primeras características morfológicas distintivas de la apoptosis es la pérdida de la unión celular, cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de la condensación de la cromatina. Más avanzado el evento se observa la fragmentación nuclear. Particularmente, la condensación de la cromatina se puede observar como una hipercromicidad muy homogénea del ADN en el núcleo de las células apoptóticas y se evidencia al teñir precisamente con hematoxilina y eosina (Álvarez, 2007).

En la Figura 24a y b se observa a las células correspondientes a los controles negativos (sin tratamiento y con DMSO 0.2%), las cuales poseen una forma alargada, se observan confluentes y formando parte de la monocapa. El núcleo, teñido de morado posee su morfología normal en cada célula y algunas de ellas aparecen en un proceso de división celular, de igual forma, el citoplasma teñido más claro, no presenta ningún tipo de alteración.

Por otra parte, las células tratadas con Taxol (Figura 24c) muestran cambios importantes en su morfología, ya no presentan la forma alargada típica, sino que se observa reducción en el tamaño celular, debido a ello algunas células poseen una forma esférica y hay formación de cuerpos apoptóticos; además se manifiesta la condensación de la cromatina en la región del núcleo, por lo cual se tiñe de manera más intensa. También se observa que ha disminuido la confluencia celular; todos estos cambios reflejan la inducción de la apoptosis, como se ha reportado previamente (Ofir, *et al*, 2002)

Por otro lado, cuando las células fueron expuestas al extracto hexánico también se observaron cambios morfológicos muy importantes. A partir de las 6 h de tratamiento (Figura 24d), si bien detectamos células con la morfología alargada típica, en algunas otras células, se observó reducción del tamaño celular, la membrana plasmática comenzó a deformarse, presentaron una disminución en el espacio citoplasmático y comenzó a observarse una agregación de la cromatina, a diferencia de los controles negativos. A las 12 h de tratamiento (Figura 24e), las células continúan cambiando su morfología, ya no presentan una confluencia como en los controles negativos, hay contracción celular evidente debido a la pérdida de agua, además de condensación de la cromatina.



**Figura 24. Tinción con hematoxilina y eosina de la línea celular MDA-MB-231. a) Células sin tratamiento; b) células con DMSO 0.2%; c) células con Taxol 0.25 µg/ml; d-h) células con extracto hexánico de *P. edulis* a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72h. ca: cuerpos apoptóticos. 20x.**

Estos cambios en la morfología celular se fueron acentuando conforme aumentó el tiempo de exposición al extracto hexánico desde las 24 hasta las 72 h (Figura 24f, g, h). Incluso, algunas células tratadas con el extracto y que se encontraban en un proceso de división celular se observan de igual forma alteradas.

La condensación de la cromatina es una característica importante que se observó en estas células, dicha condensación se manifestó en las células con una morfología redondeada, en las zonas teñidas con más intensidad en la región nuclear, por lo que ocupa la mayor parte de la célula.

De manera importante también se observa que conforme incrementa el tiempo de tratamiento en las células, la confluencia celular disminuye de manera considerable. Todos estos cambios morfológicos observados en las células MDA-MB-231 son característicos del proceso de muerte celular por apoptosis, el cual está siendo inducido por el extracto hexánico de *P. edulis*.

#### **5.4.2 Ensayos con Anexina V**

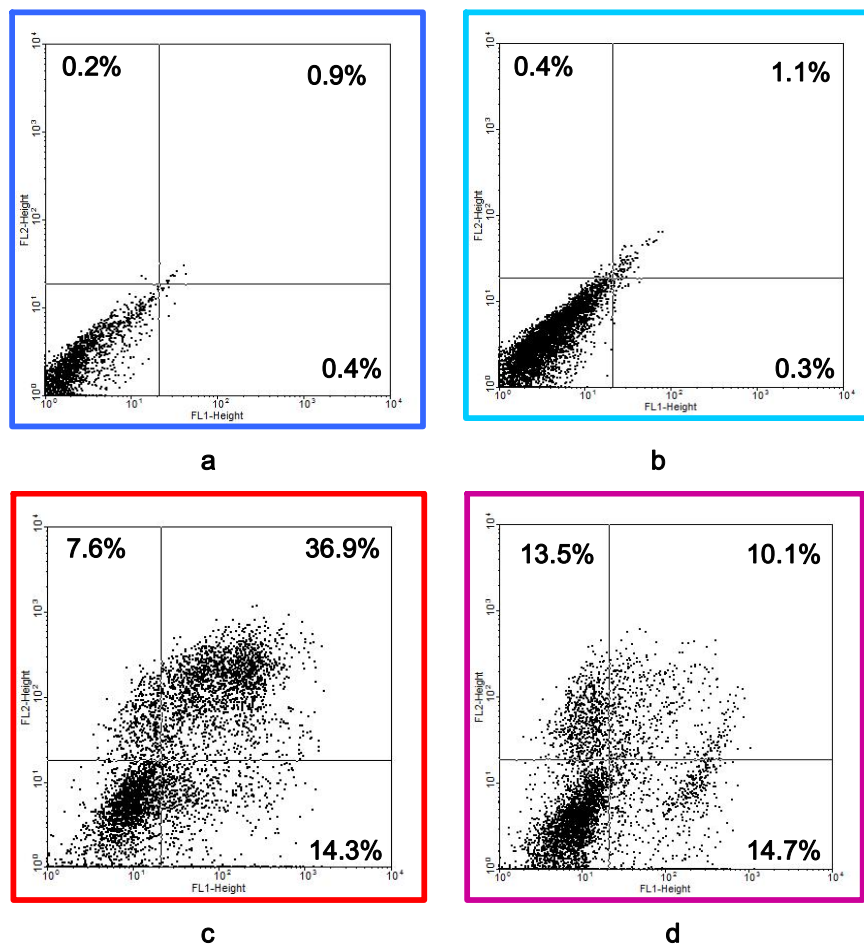
Una vez evaluados estos cambios en la morfología de las células de la línea tumoral ante la presencia del extracto hexánico, se procedió a realizar los ensayos con Anexina V, esto con el propósito de investigar el mecanismo de muerte celular (apoptosis o necrosis) que está induciendo el extracto en las células MDA-MB-231. Para ello las células fueron expuestas al extracto hexánico a una dosis de 94.63 µg/ml a tiempos de 6, 12, 24 y 48 h.

##### **5.4.2.1 Tratamiento a las 6 h de exposición**

En los ensayos con Anexina V a un tiempo de 6 h, se observó que las células sin tratamiento y tratadas con DMSO 0.2%, se encuentran en su mayoría viables representando un 98% y un solo porcentaje de células se encuentra en apoptosis y necrosis (Figura 25a y b).

Por otra parte las células que fueron tratadas con Taxol muestran una población celular que se encuentra principalmente en apoptosis representando un 51.2% de la población (Figura 25c).

Mientras que en el caso de las células que fueron tratadas con el extracto hexánico se observó una población celular (24.8%) tanto en apoptosis como en necrosis (13.5%) (Figura 25d), indicando que desde este tiempo el extracto hexánico ha comenzado a alterar la viabilidad celular



**Figura 25. Ensayos con Anexina V al tiempo de tratamiento de 6 h.** a) Células sin tratamiento; b) células con DMSO 0.2%; c) células con Taxol 0.25 µg/ml y d) células con extracto hexánico de *P. edulis* (94.63 µg/ml).

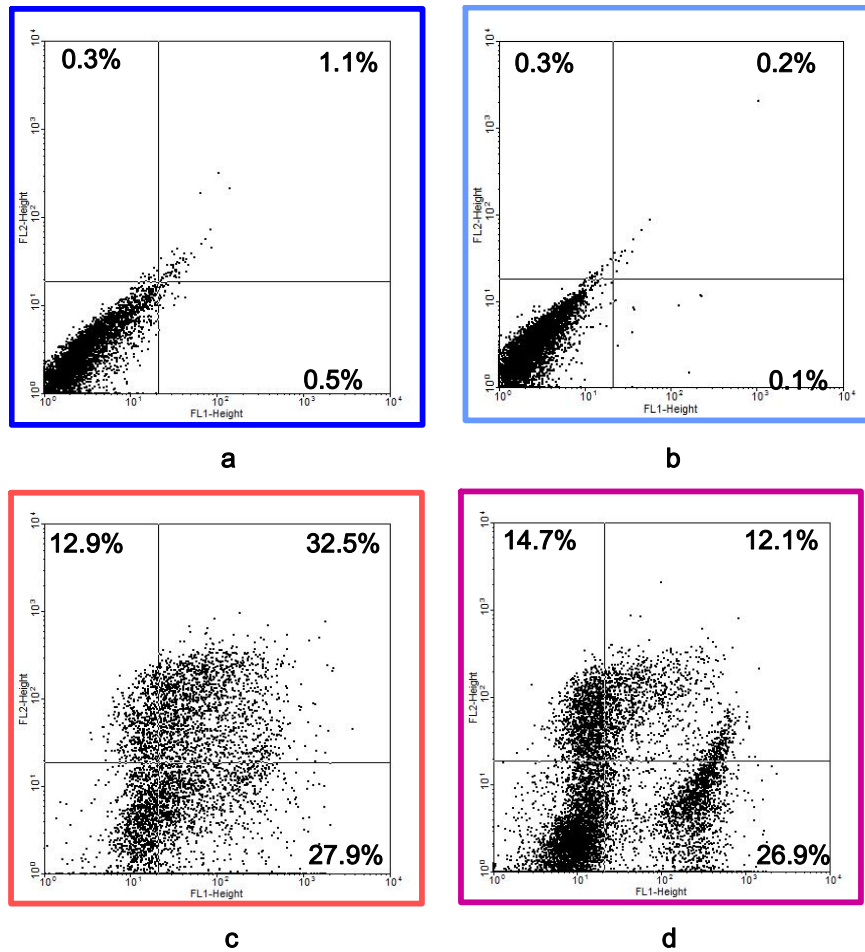
#### 5.4.2.2 Tratamiento a las 12 h de exposición

Asimismo, cuando las células fueron tratadas a tiempos de 12 h se observó que los controles negativos correspondientes a células sin tratamiento y con DMSO 0.2% poseen un porcentaje alto de células viables (98%), siendo pocas las células que se encuentran en apoptosis y necrosis (Figura 26a y b).

Por otro lado el control positivo tratado con Taxol muestra a las células principalmente en apoptosis representando un 60.4 % de la población celular (Figura 26c).

Ahora bien, cuando las células fueron tratadas con 94.63 µg/ml del extracto hexánico por un periodo de 12 h, se observó un incremento en el porcentaje celular en un 15.4 % de aquellas

células en apoptosis (39%) y necrosis (14.7 %) con respecto a lo observado en el tiempo de 6h (Figura 26d).



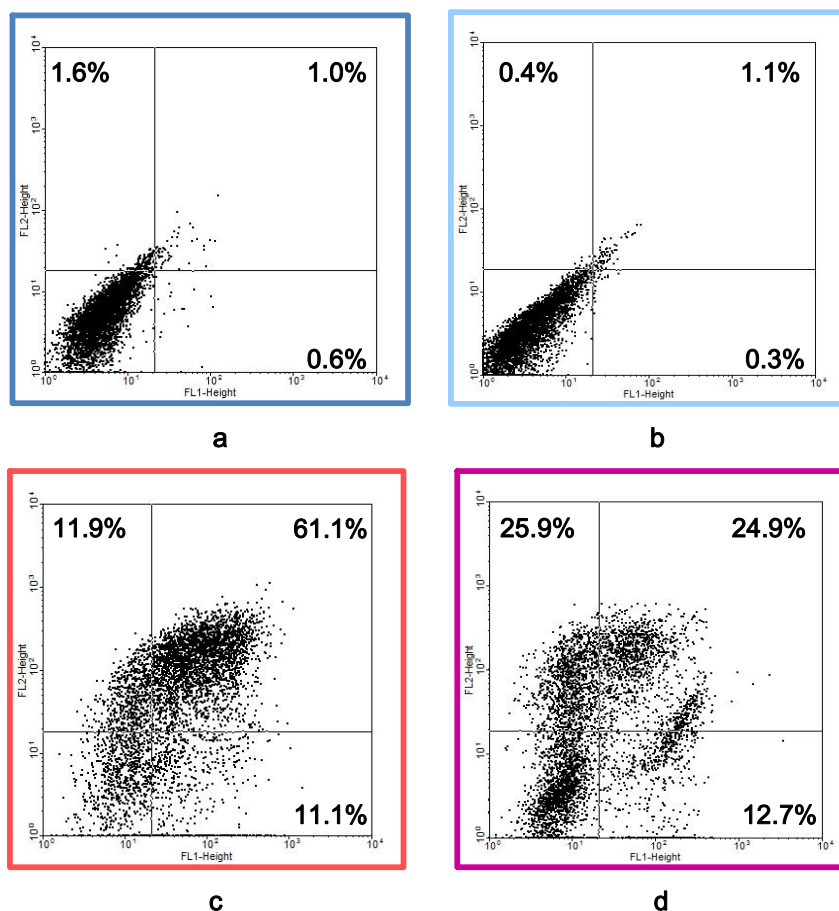
**Figura 26. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 12 h. a) Células sin tratamiento; b) células con DMSO 0.2%; c) células con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$  y d) células con extracto hexánico de *P. edulis* (94.63  $\mu\text{g/ml}$ ).**

#### 5.4.2.3 Tratamiento a las 24 h de exposición

Con el tratamiento a un tiempo de exposición de 24 h se observó de igual forma que tanto las células sin tratamiento como aquellas tratadas con DMSO 0.2 % permanecen en su mayoría viables representando alrededor de un 98% y un porcentaje bajo de células (2.5%) se encuentran en apoptosis y necrosis (Figura 27 a y b).

Por otra parte en las células tratadas con Taxol se observó que el porcentaje en apoptosis incrementó representando un 72.2 % de la población celular (Figura 27c).

En el caso de las células que fueron tratadas con el extracto hexánico durante 24 h se observó el mismo patrón en donde el porcentaje de células tanto en apoptosis (37.6%) como en necrosis (25.9%) continuó incrementando, mientras que el porcentaje de las células viables disminuyó (36.8%) (Figura 27d), mostrando claramente el efecto tóxico del extracto sobre las células MDA-MB-231.



**Figura 27. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 24 h.** a) Células sin tratamiento; b) células con DMSO 0.2%; c) células con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$  y d) células con extracto hexánico de *P. edulis* (94.63  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 5.4.2.3 Tratamiento a las 48 h de exposición

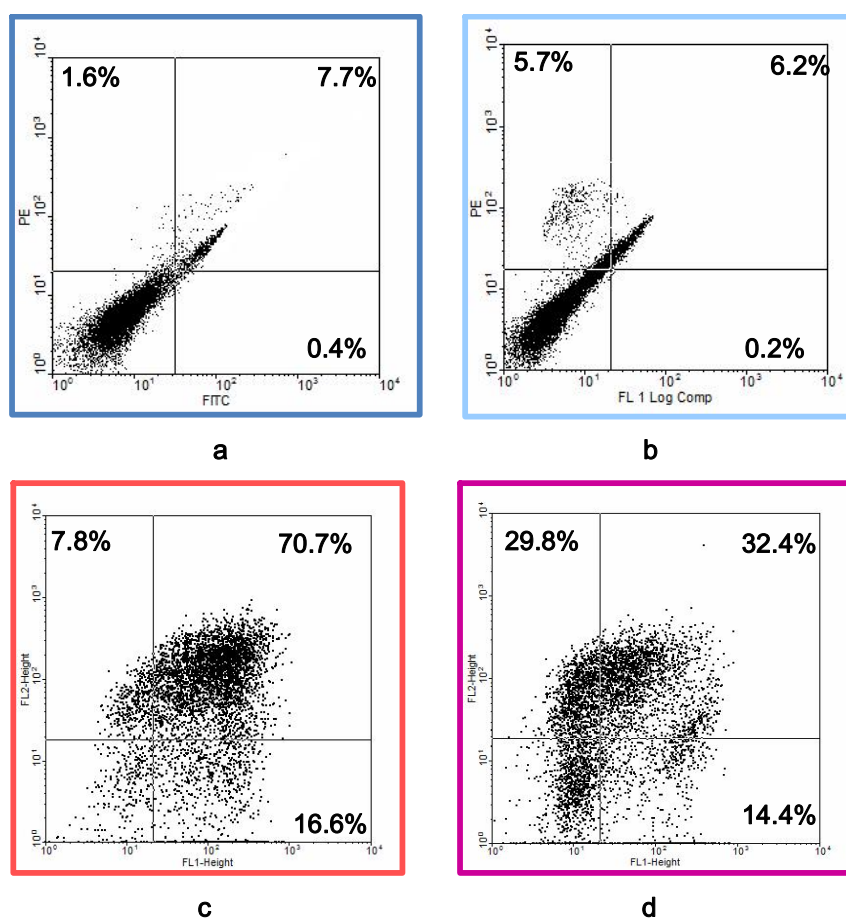
Asimismo, a diferencia de los demás tiempos de exposición, en el caso de los controles negativos observamos que a las 48 h el porcentaje de células viables tanto de las células sin tratamiento como de aquellas expuestas al DMSO 0.2% ha disminuido a un 90%, además de que ha aumentado un poco el porcentaje de células en apoptosis y necrosis (9.6%), esto se debe a que estas células controles están a más de un 100% de confluencia a las 48 h, lo cual provoca que se



empiecen a morir debido ya a una sobrepoblación del cultivo celular, sin embargo si hubo diferencia con aquellas células que fueron tratadas (Figura 28a y b).

En el caso del control positivo con Taxol, observamos que un 87.3% de la población celular se encuentra en apoptosis (Figura 28c).

Cuando las células fueron tratadas con el extracto hexánico durante 48 h, los ensayos de Anexina V mostraron un incremento en el porcentaje de células en apoptosis (46.8%) y en necrosis (29.8%) con respecto a los otros tiempos analizados. Señalando la dosis y tiempo dependencia del efecto del extracto hexánico sobre la línea celular de cáncer de mama (Figura 28d).



**Figura 28. Ensayos con Anexina V a un tiempo de tratamiento de 48 h.** a) Células sin tratamiento; b) células con DMSO 0.2%; c) células con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$  y d) células con extracto hexánico de *P. edulis* (94.63  $\mu\text{g/ml}$ ).

En las siguientes gráficas se muestran los porcentajes de las células en apoptosis y necrosis para cada uno de los tratamientos en los ensayos con Anexina V.

En las Figuras 29 y 30 se observa a las células sin tratamiento, en donde a lo largo de los tiempos de exposición existe un porcentaje bajo en apoptosis y necrosis, por lo que la mayoría permanece viable.

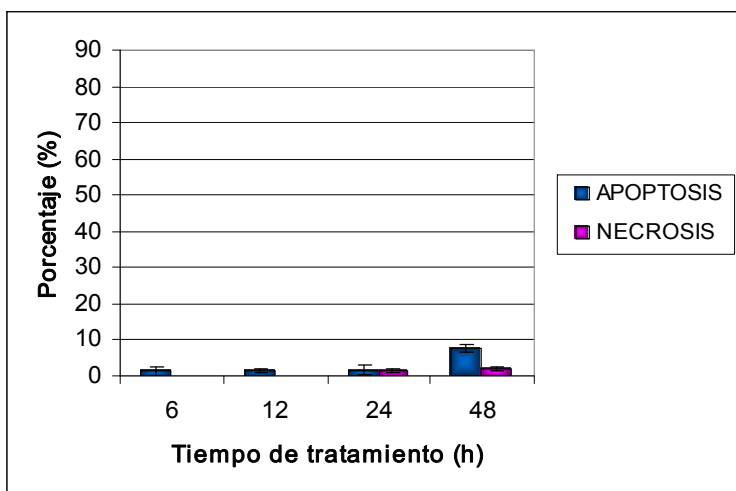


Figura 29. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células sin tratamiento de los ensayos con Anexina V.

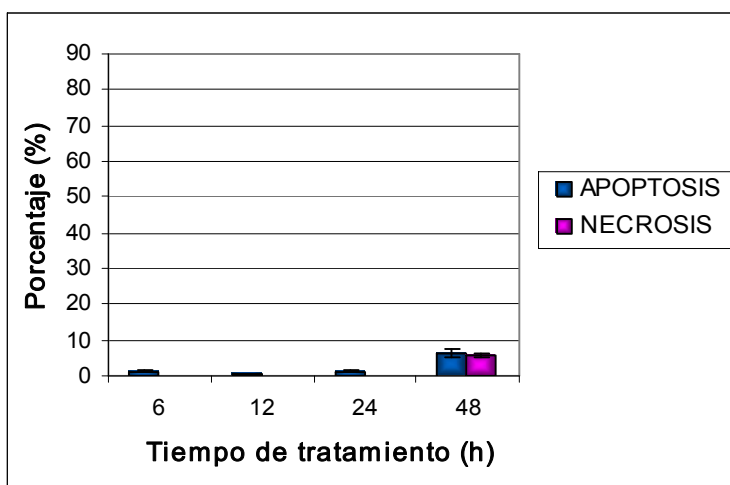
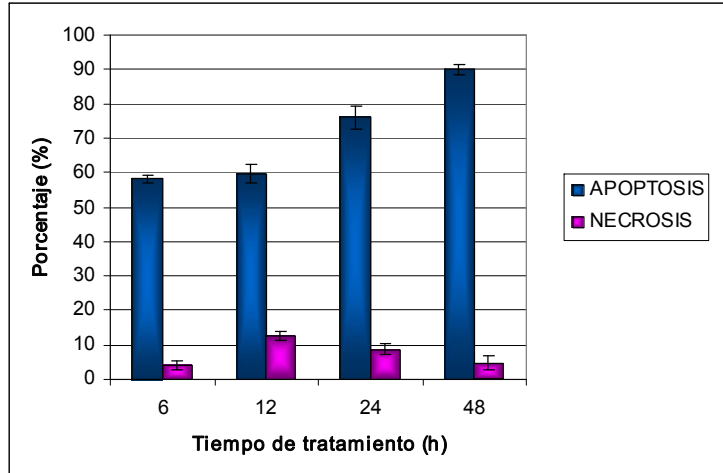


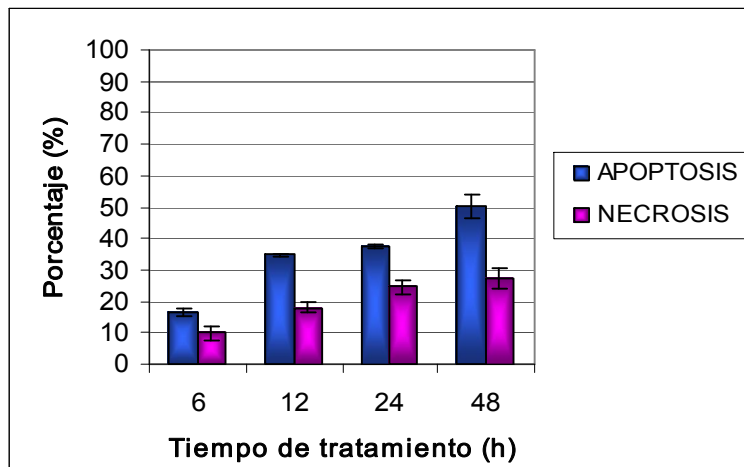
Figura 30. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con DMSO 0.2% de los ensayos con Anexina V.

En la Figura 31 se observan las células tratadas con el control positivo, que fue el Taxol en donde existe un incremento en el porcentaje de la apoptosis conforme aumentan los tiempos de exposición, observándose un porcentaje bajo en necrosis a lo largo del tratamiento.



**Figura 31. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con Taxol 0.25 µg/ml de los ensayos con Anexina V.**

En la Figura 32 se observan a las células tratadas con el extracto hexánico, en donde observamos que desde tiempos cortos existe una muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis, esta tendencia aumenta conforme incrementa el tiempo de exposición. Esto nos indica que el extracto hexánico está induciendo muerte celular en la línea tumoral MDA-MB-231, la cual es principalmente por apoptosis.

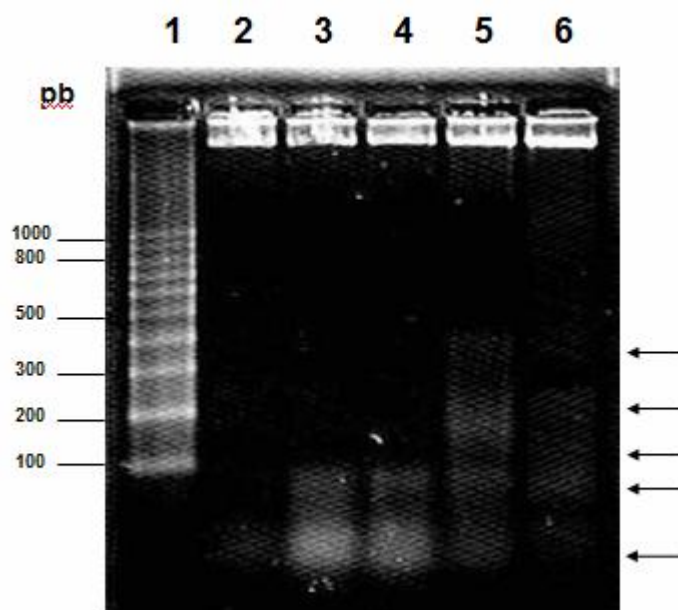


**Figura 32. Porcentaje de apoptosis y necrosis en las células tratadas con el extracto hexánico a una dosis de 94.63 µg/ml de los ensayos con Anexina V.**

## 5.5 Evaluación del efecto del extracto hexánico en la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral MDA-MB-231

### 5.5.1 Electroforesis en gel

Dado que efectivamente el extracto hexánico estaba ejerciendo un efecto letal sobre la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 y al parecer estaría provocando una muerte celular de tipo apoptótico y necrótico, se procedió a realizar ensayos para evaluar la fragmentación del ADN en las células tumorales expuestas al extracto, con la finalidad de identificar características de uno de estos tipos de muerte celular como es la apoptosis. Para ello las células fueron tratadas con DMSO al 0.2% (control negativo), Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$  (control positivo) y con el extracto hexánico 94.63  $\mu\text{g/ml}$  a tiempos de 12, 24 y 48 h. Posteriormente, mediante la técnica de fenol-cloroformo se extrajo el ADN de las células de cada uno de los tratamientos y se hicieron geles de agarosa al 2% para observar el patrón en escalera representativo de la fragmentación del ADN y por lo tanto de células en apoptosis.



**Figura 33. Fragmentación del ADN de las células de la línea MDA-MB-231 expuestas al extracto hexánico.** Carril 1: marcador de 100 pb, carril 2: células sin tratamiento; carril 3: células tratadas con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; carril 4-6: células tratadas con el extracto hexánico 94.63  $\mu\text{g/ml}$  a tiempos de 12, 24 y 48 h. Las flechas señalan algunos de los fragmentos de ADN.

En la Figura 33 observamos un gel de agarosa al 2%, en donde el ADN obtenido de las células sin tratamiento, se observa integro, representativo células viables. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con Taxol, se observa una degradación del ADN, detectando bandas de un tamaño

molecular menor a 100 pb, lo cual nos indica que el ADN está fragmentado, señal de una célula en proceso de muerte celular.

Interesantemente, cuando las células se expusieron al extracto hexánico a tiempos de 12, 24 y 48 h se observó la formación de un bandeo en escalera característico de una célula en un evento de apoptosis (Figura 33, carriles 4-6). Este bandeo se fue incrementando conforme se aumentó el tiempo de exposición de las células al extracto, observándose una mayor intensidad de los fragmentos en el tiempo de 24 h. Los resultados de estos ensayos de fragmentación de ADN corroboran que las células tumorales están entrando en un evento de apoptosis como resultado de la administración del extracto hexánico, así como se observó en el caso del control positivo con Taxol.

### 5.5.2 Ensayo de TUNEL

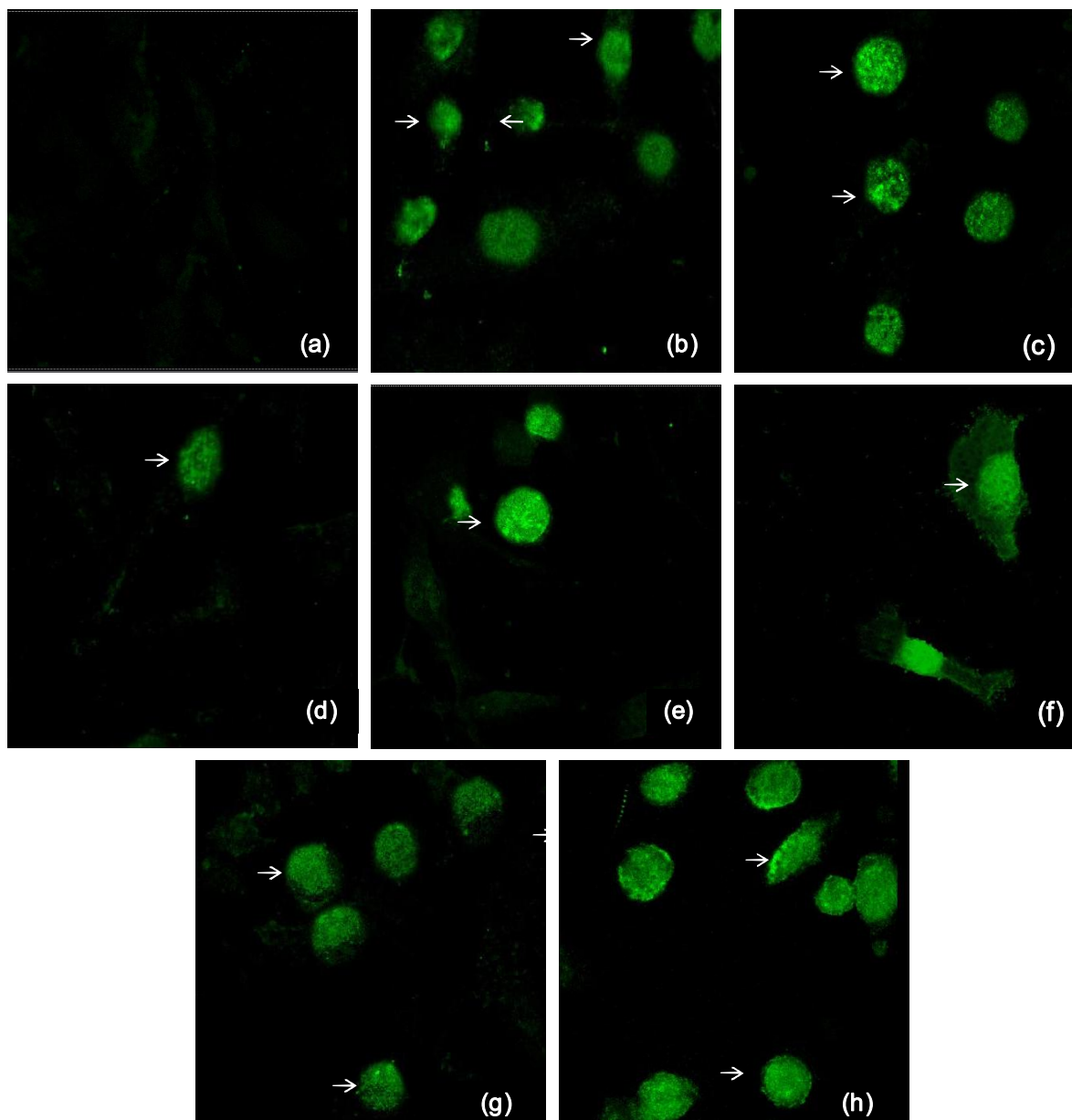
Si bien, en el apartado anterior se mostró que las células expuestas al extracto hexánico presentan fragmentación del ADN, mostrando el patrón en escalera característico; era necesario evidenciar la fragmentación nuclear en las células, de forma individual y determinar la proporción de éstas que están muriendo con respecto al tiempo de tratamiento. Para ello, se realizaron ensayos utilizando la técnica de TUNEL. Esta técnica permitió visualizar el patrón de fragmentación del material genético, mediante microscopia de fluorescencia.

Los resultados mostraron que las células sin tratamiento no presentaron fluorescencia, esto debido a que permanecen viables y normales, por lo cual, no hay inducción de apoptosis y no se presenta ninguna alteración en el material genético (Figura 34a).

En contraste, la mayoría de las células tratadas con DNasa 3000 U/ml (85%) y Taxol 0.25 µg/ml (90%), mostraron zonas fluorescentes correspondientes a la región nuclear, lo cual indica que el ADN se está fragmentado como resultado de la actividad de la nucleasa y de la apoptosis, como ya ha sido previamente reportado (Figura 34b y c) (Wang, et al. 2000).

Interesantemente, cuando las células fueron expuestas al extracto hexánico, se observó que desde tiempos cortos de tratamiento, como lo fueron 6 h (Figura 34d), alrededor de un 9.25% de las células presentaban fluorescencia en sus núcleos, indicando la fragmentación del ADN. Sin embargo a este tiempo de exposición, la mayor parte de la población celular permaneció viable, lo cual nos corroboró los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Más aún, cuando las células fueron expuestas al extracto a tiempos de 12, 24, 48 y 72 h (Figura 34e, f, g y h), se observó un incremento en dicho proceso de fragmentación de 30, 75, 72 y 90% respectivamente, lo cual reitera que el extracto hexánico tiene un efecto sobre las células tumorales al inducir apoptosis en ellas.

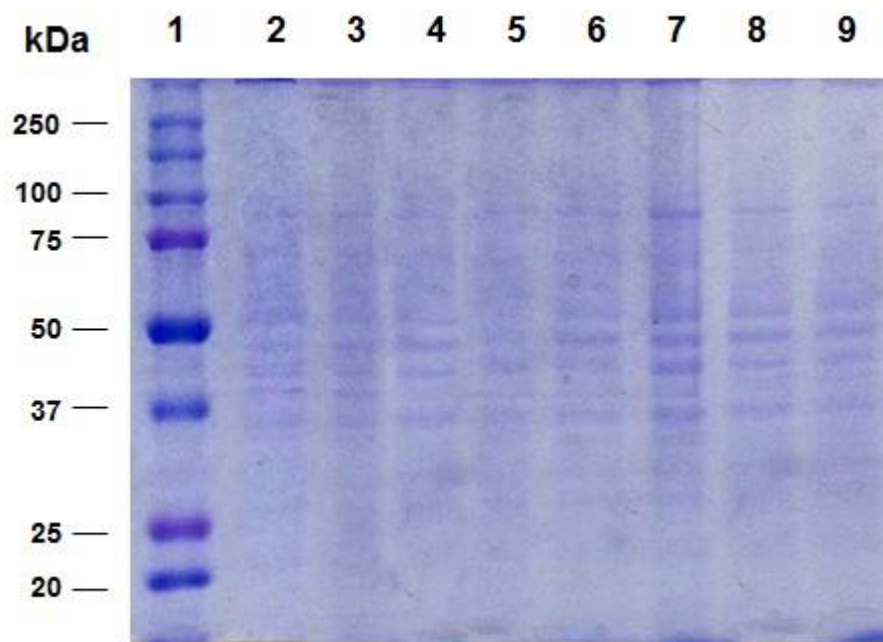
Estos ensayos por lo tanto, indican que el extracto hexánico a una dosis de 94.63  $\mu\text{g/ml}$  induce un proceso de fragmentación del ADN de manera tiempo dependiente.



**Figura 34. Determinación de la fragmentación del ADN, en las células MDA-MB-231, incubadas con el extracto hexánico a través del ensayo de TUNEL. a) Células sin tratamiento; b) células tratadas con DNAsa (3000 U/ml); c) células tratadas con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; d-g) células tratadas con el extracto hexánico 94.63  $\mu\text{g/ml}$  a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h respectivamente. Las flechas señalan los núcleos conteniendo el ADN fragmentado.**

## 5.6 Expresión de marcadores apoptóticos

La determinación de la activación de las moléculas que inducen el proceso de apoptosis como las caspasas es indispensable. Por lo que, con la finalidad de conocer si algunas de las vías de señalización que inducen el evento de apoptosis está siendo activada como efecto de la exposición de las células tumorales MDA-MB-231 con el extracto hexánico, se realizó la inmunodetección de las moléculas caspasa 3, 8 y 9. Primeramente, las células se crecieron en presencia del extracto hexánico a tiempos de tratamiento de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Asimismo, se incluyeron los controles negativos, que fueron células sin tratamiento y con DMSO 0.2% y el control positivo de células tratadas con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$ . Concluidos los tiempos de exposición, las células se cosecharon y se obtuvieron los extractos totales correspondientes.

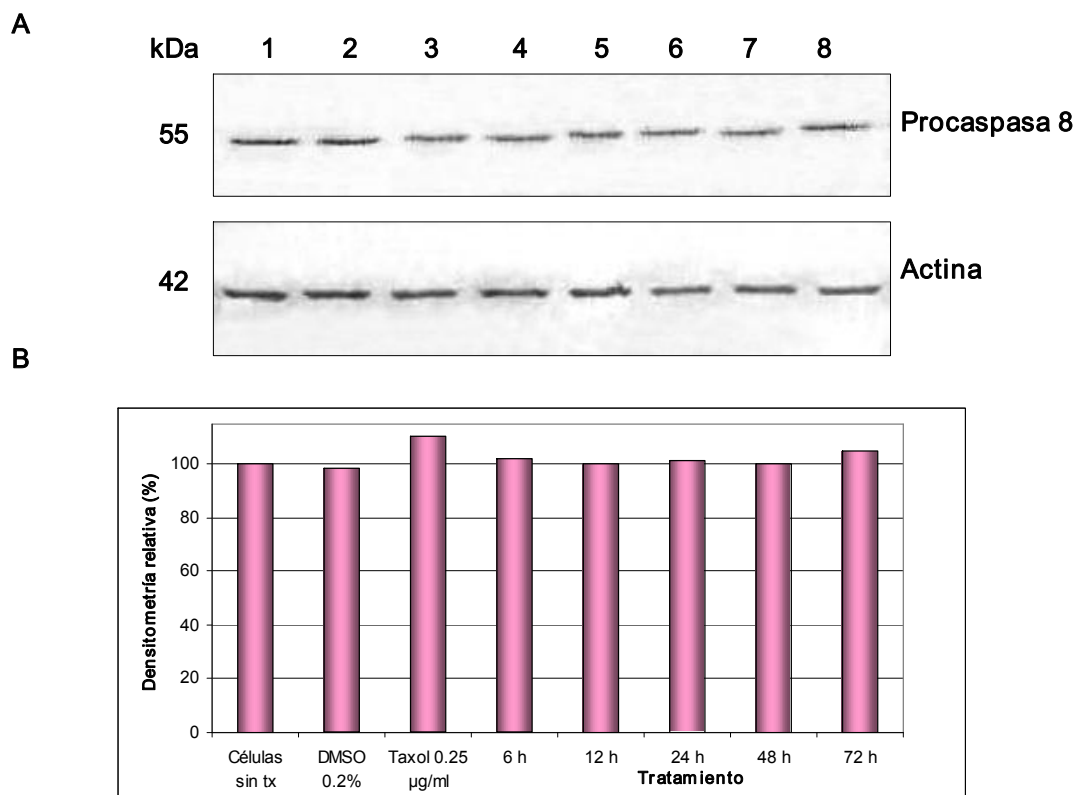


**Figura 35. Integridad de las proteínas de la línea celular MDA-MB-231, en un gel de acrilamida-SDS al 12%.** Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, células sin tratamiento; carril 3, células con DMSO 0.2%; carril 4, células con Taxol 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; carriles 5-9, células tratadas con el extracto hexánico a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h

En la Figura 35 se muestra un gel de acrilamida-SDS al 12% teñido con azul de Coomassie, en el cual se corrieron 30  $\mu\text{g}$  de cada extracto proteico obtenido, con la finalidad de determinar la integridad de las proteínas. Como se puede observar esta figura, todos los extractos presentaron una buena calidad en su integridad proteica, por lo que se procedió a estandarizar las condiciones de inmunodetección para el análisis de las moléculas: caspasa 3, 8 y 9.

### 5.6.1 Análisis de la expresión de la Caspasa 8

Para poder analizar las caspasas a estudiar es importante señalar que las procaspasas se encuentran en forma inactiva en el citoplasma y cuando se induce la apoptosis éstas se activan y se denominan caspasas. La caspasa 8 es una proteína iniciadora que forma parte de la vía extrínseca activada por los receptores de la familia TNF y es utilizada como un marcador temprano de la apoptosis (Ghobrial, et al. 2005; Chen y Wang, 2002; Degterev, et al, 2003).



**Figura 36. Expresión de la procaspasa 8 en la línea celular MDA-MB-231.** A) Carril 1, células sin tratamiento; carril 2, células con DMSO 0.2%; carril 3, células con Taxol 0.25 µg/ml; carril 4-9, células tratadas con el extracto hexánico a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. B) Densitometría de la membrana correspondiente a la inmunodetección de la procaspasa 8.

Por tal motivo, con la finalidad de determinar si el evento de apoptosis observado en las células MDA-MB-231 es inducido por la vía extrínseca, se realizó la evaluación de la expresión de la procaspasa 8. Los resultados del ensayo de Western blot, así como de la densitometría, muestran que la expresión de esta procaspasa (forma inactiva de 55 kDa) es constante a lo largo de todos los tiempos de tratamiento de las células MDA-MB-231 expuestas al extracto hexánico (Figura 36A, carriles 4-9), así como en los controles negativos (células sin tx y con DMSO 0.2%) y positivo (Taxol 0.25 µg/ml) (Figura 36A, carril 1 y 2). Esto nos indica que la procaspasa 8 no se activó, ya

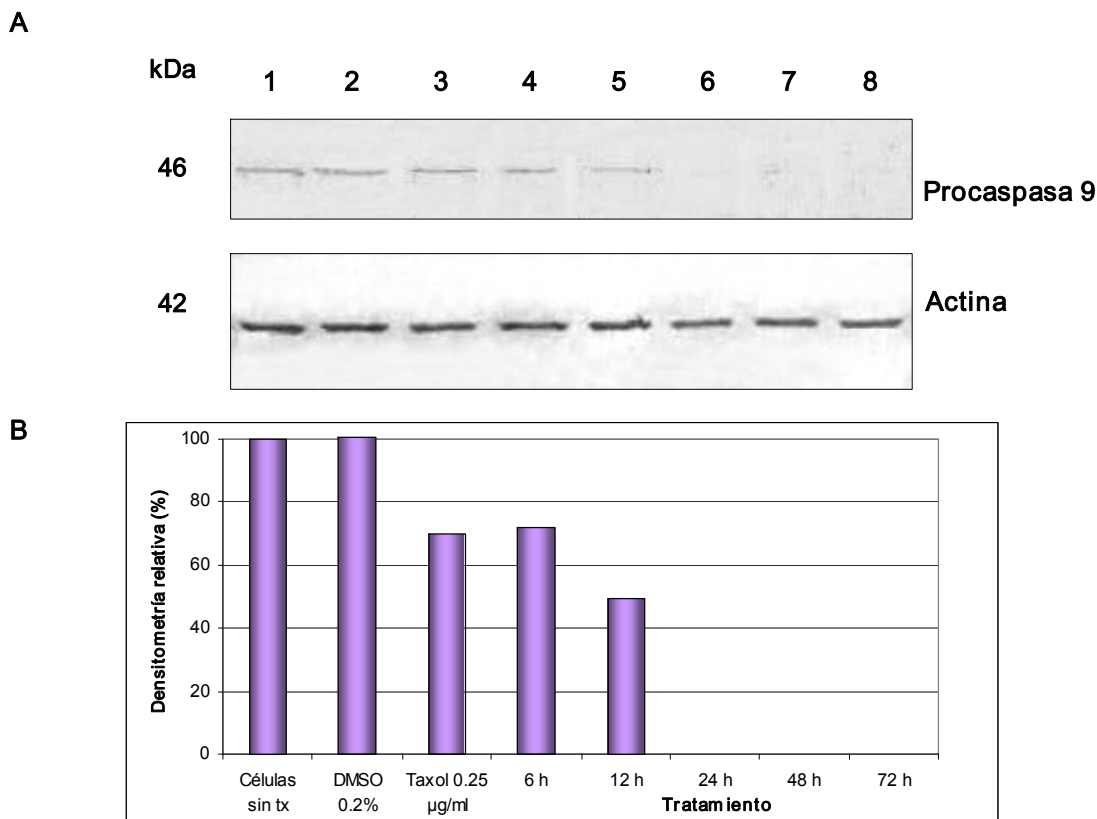


que no se detectaron cambios en la expresión de esta procaspasa, ni fragmentos de menor peso molecular, que indicarían la presencia de la caspasa 8 (forma activa de 18 kDa). Por lo tanto, la vía extrínseca no se enciende en la línea celular utilizada, como respuesta al tratamiento con el extracto hexánico de *P. edulis*.

Los valores obtenidos con el análisis densitométrico nos corroboraron los resultados observados en el Western blot (Figura 36B). Asimismo, como control del ensayo se identificó a la actina, cuya expresión se observa constante en todas las condiciones estudiadas.

### 5.6.2 Análisis de la expresión de la Caspasa 9

Por otra parte, también se evaluó la expresión de la caspasa 9 (Figura 23), esta proteína es una proteasa iniciadora que participa en la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Ghobrial, et al. 2005; Chen y Wang, 2002; Degterev, et al, 2003).



**Figura 37. Expresión de la procaspasa 9 en la línea celular MDA-MB-231.** A) Carril 1, células sin tratamiento; carril 2, células con DMSO 0.2%; carril 3, células con Taxol 0.25 µg/ml; carril 4-9, células tratadas con el extracto hexánico a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. B) Valores obtenidos del análisis densitométrico. B) Densitometría de la membrana correspondiente a la inmunodetección de la procaspasa 9.

En este caso se observó la expresión de la procaspasa 9 (46 kDa) en las células expuestas al extracto hexánico a partir de las 6 h de tratamiento. Sin embargo, esta expresión disminuyó en un 28 y 50% (6 y 12 h) conforme se incrementó el tiempo de exposición de las células hacia el extracto (Figura 37A y B, carriles 4-8); observando que a partir de las 24 hasta las 72 h de tratamiento, ya no se detectó la expresión de esta procaspasa, a diferencia de los controles negativos y positivo. Estos resultados indican que la procaspasa 9 se está activando en los ensayos realizados, a partir de las 6 h de exposición.

De igual forma, observamos que, el control positivo de las células expuestas con Taxol también presentaron una disminución de la expresión de la procaspasa 9 (Figura 37a, carril 3), lo cual coincide con reportes que nos indican que el Taxol puede inducir una muerte celular mediante la vía intrínseca (Wang, *et al*, 2000). Ahora bien, los cambios observados en la expresión de la procaspasa 9 se deben al efecto del extracto, ya que el control de expresión incluido, que es la proteína actina, no presentó cambios.

Estos resultados nos muestran que el extracto hexánico está activando la vía intrínseca de la apoptosis. Así mismo, los valores obtenidos con el análisis densitométrico nos corroboran estos resultados (Figura 37B).

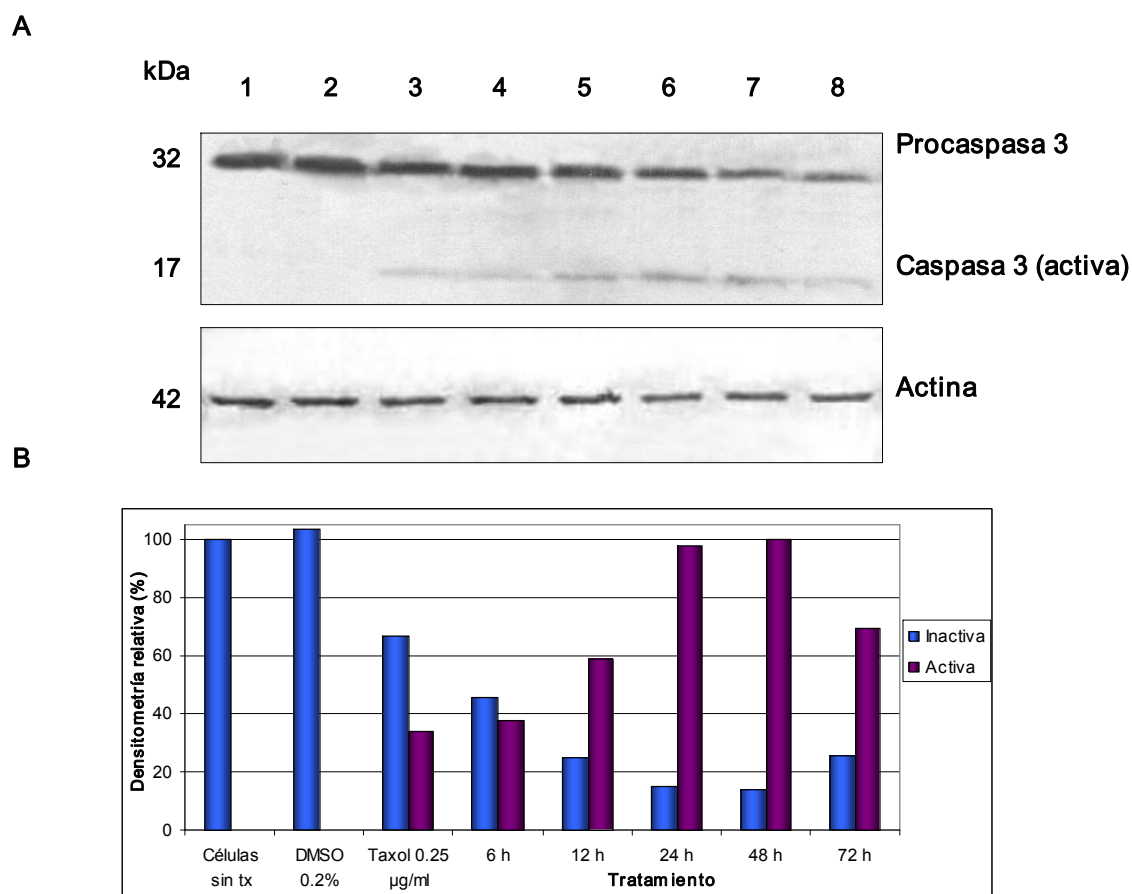
### **5.6.2 Análisis de la expresión de la Caspasa 3**

Posteriormente se evaluó la activación de la procaspasa 3, esta es una caspasa efectora encargada de inducir directamente la apoptosis y la cual se activa con la inducción tanto de vía extrínseca como intrínseca. También ha sido ampliamente utilizada como un marcador temprano de la apoptosis (Porter, et al. 1999; Ghobrial, et al. 2005; Degterev, et al, 2003).

Interesantemente, los resultados nos muestran la expresión de la procaspasa 3 (32 kDa) con un valor de 45%, en las células expuestas al extracto hexánico desde el tiempo más corto estudiado que fue de 6 h. No obstante esta expresión fue disminuyendo con valores de 24, 14 y 13% conforme se incrementó el tiempo de exposición respectivamente de las células al extracto (Figura 24a, carriles 4-8); a diferencia de las células sin tratamiento y con DMSO 0.2% (Figura 38A, carriles 1 y 2). De forma aún más interesante, también se observó la expresión de la forma activa de la caspasa 3, la cual tiene un menor peso molecular (17 kDa) que la procaspasa. La expresión de la caspasa 3 se detectó también a partir de las 6 h (37%) y ésta se incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición de las células con el extracto, mostrando el máximo de expresión a las 48 h (99%), posterior a este tiempo la detección de la caspasa 3 comenzó a disminuir.

Estos resultados coinciden con la expresión de la caspasa 9, que se observó previamente (Figura 37), ya que ésta proteína es capaz de activar a la caspasa 3 para la ejecución de la apoptosis.

La expresión de la forma activa también se observó en las células tratadas con Taxol (Figura 38A, carril 3), lo cual coincide con reportes previos, donde esta caspasa se activa como efecto de la apoptosis (Wang, et al, 2000). En contraste, aquellas células correspondientes a los controles negativos solo expresaron la forma inactiva de la caspasa. Así mismo, los valores obtenidos con el análisis densitométrico nos corroboran estos resultados (Figura 38B).



**Figura 38. Expresión de la Caspasa 3 en la línea celular MDA-MB-231.** Carril 1, células sin tratamiento; carril 2, células con DMSO 0.2%; carril 3, células con Taxol 0.25 µg/ml; carril 4-9, células tratadas con el extracto hexánico a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. B) Densitometría de la membrana correspondiente a la inmunodetección de la procaspasa 3.

Estos resultados nos indican que al observar la activación tanto de la caspasa 3, como de la caspasa 9, la vía de inducción de la apoptosis que se está activando como efecto de la exposición de las células MDA-MB-231 al extracto hexánico, es la vía intrínseca o mitocondrial.

## 6. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, particularmente, en mujeres, el cáncer de mama y el cérvicouterino son los de mayor incidencia. Actualmente los tratamientos que se emplean para controlar y en el mejor de los casos eliminar dicho padecimiento son la radioterapia y quimioterapia, en donde desafortunadamente muchos de los medicamentos que se utilizan provocan efectos secundarios y multirresistencia a drogas (Benson, *et al.* 2006). Debido a ello, se están buscando nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, que posean una mayor especificidad hacia las células tumorales, menor toxicidad hacia las células normales, que generen menores efectos secundarios y que disminuyan la resistencia a éstos. Se considera que las plantas medicinales son un recurso importante para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antitumoral, ya que algunos como el paclitaxel, camptotecina, vincristina y etopósido, se emplean actualmente en la clínica; además de que alrededor del 60% de los fármacos antitumorales provienen de recursos naturales (Graham; *et al.*, 2000; Cragg y Newman, 2005; Baily, 2009).

Debido a ello, en el presente trabajo se evaluó el efecto antitumoral de diferentes extractos de la corteza de tallo de *P. edulis*, en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Para ello, primeramente se realizó la colecta de la corteza del tallo y la obtención de datos etnobotánicos, los cuales nos indicaron que la planta se utiliza de manera tradicional para el tratamiento de cáncer de mama. Algunos estudios realizados en otras plantas de la familia Bignoniaceae, a la cual pertenece *P. edulis*, señalan que diferentes extractos como el diclorometano de *Kigelia ssp* (Kolodziej, 1997; Jackson, *et al.* 2000; Moura, *et al.* 2002), el etanólico de *Jacaranda ssp.* (Gachet y Schuhly, 2008) y el metanólico de *Tabebuia ssp.* (Queiroz, *et al.* 2008) poseen un efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* principalmente para el tratamiento del cáncer de mama, estómago y melanoma respectivamente.

Una vez colectada la planta, se obtuvieron los extractos acuoso, acetónico y hexánico. Para evaluar el efecto citotóxico de estos extractos en la línea celular de cáncer MDA-MB-231, se realizaron ensayos con la técnica MTT, en cada ensayo se administraron distintas concentraciones de los extractos, a tiempos de 24, 48 y 72 h, además de utilizar los controles positivo (Taxol 0.25 µg/ml) y negativos correspondientes (Sin Tx y DMSO 0.2%). Cabe mencionar que el Taxol es un agente anticancerígeno, el cual promueve el ensamblamiento de los microtúbulos e inhibe su despolimerización, arrojando a las células en la fase G2/M, además como consecuencia a esto, se induce apoptosis mediante distintas vías, es por ello, que se seleccionó a este compuesto como control positivo (Wang, *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos de los ensayos MTT nos mostraron que, el extracto acuoso no tuvo efecto antitumoral en la línea celular de cáncer de mama, ya que la viabilidad se mantuvo

constante alrededor del 100% durante todos los tratamientos, así como en los controles negativos. Por otro lado, el extracto acetónico tuvo un ligero efecto citotóxico principalmente a una concentración de 350 µg/ml a las 72 h. A diferencia de éstos, el extracto hexánico mostró el mayor efecto antitumoral; se observó que desde una dosis administrada de 25 µg/ml del extracto a las 24 h de tratamiento, hubo disminución de la proliferación celular, observando el máximo efecto a una concentración de 350 µg/ml a un tiempo de 72 h. Siendo, el efecto observado tanto dosis como tiempo dependiente. El valor IC<sub>50</sub> obtenido para este extracto fue de 94.63 µg/ml, a esta dosis mata al 50% de las células tumorales de la línea MDA-MB-231.

Estudios realizados en otras plantas han mostrado valores de IC<sub>50</sub> inferiores o superiores al que se obtuvo en este trabajo. En el caso de *Artocarpus altilis* se observó que, el extracto dietiléter del tallo mostró un valor IC<sub>50</sub> de 6.19 µg/ml en la línea celular de cáncer de mama T47D (Tangke, *et al.* 2009); mientras que estudios con *Chrysanthemum indicum* mostraron que el extracto etanólico de los frutos obtuvo un valor IC<sub>50</sub> de 1009 µg/ml en la línea de hepatocarcinoma celular HCC-MHCC97H (Zoo-Fang, *et al.* 2009). Otros trabajos realizados con la línea celular MDA MB 231 han mostrado que, el extracto acuoso de las hojas de *Camelia sinensis* posee un IC<sub>50</sub> de 150 µg/ml (Özdikicioğlu, *et al.* 2007), mientras que el extracto metanólico de las hojas de *Syzygium jabolatum* posee un valor IC<sub>50</sub> de 270 µg/ml (Thliamplan, *et al.* 2006). Todos estos extractos analizados han sido reportados con una actividad antitumoral efectiva a la dosis IC<sub>50</sub> calculada.

Por lo tanto, tomando en consideración lo previamente descrito y los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugiere que el valor obtenido para el extracto hexánico es adecuado y la concentración óptima (IC<sub>50</sub>) parece encontrarse dentro de los rangos aceptables, además, también se ha reportado que este valor depende de la línea celular que se utilice (Lim, *et al.* 2009). Además, cabe mencionar que los extractos de las plantas poseen un valor de toxicidad mayor, que los compuestos aislados, como en el caso de la planta *Tabebuia avellanadae*, cuyo extracto acuoso de la corteza de tallo mostró un valor IC<sub>50</sub> de 1.5 mg/ml, cuando se aislaron sus componentes bioactivos como el β-lapachol, éste último mostró un valor de 4 µM para las células MCF7 (Li, *et al.* 1999 y Murkherjee, *et al.* 2009), lo cual nos reitera que los compuestos presentes en el extracto hexánico podrían tener un valor de citotoxicidad menor si se aíslan.

Ahora bien, en el análisis fitoquímico preliminar realizado en los tres extractos, observamos la presencia de distintas familias de compuestos químicos. En el extracto acuoso (compuesto polar) obtuvimos la presencia principalmente de cumarinas; para el extracto acetónico (compuesto de mediana polaridad), se observó la presencia de flavonoides, cumarinas, terpenos y quinonas; mientras que para el extracto hexánico (compuesto apolar), se observó la presencia de terpenos, cumarinas y quinonas, en donde, la única familia de metabolitos en común presente en los tres extractos fueron las cumarinas. Cada uno de los solventes con los cuales se obtuvieron estos extractos poseen una polaridad diferente, por lo tanto, la cantidad y tipo de metabolitos extraídos

con cada solvente puede variar. Además, los metabolitos que se extrajeron con cada uno de ellos, si bien pertenecen a la misma familia de compuestos químicos, corresponden a metabolitos de diferente estructura y por lo tanto el efecto citotóxico observado en el extracto hexánico se debe a la presencia de estos metabolitos. Asimismo, en un estudio realizado en *Semecarpus leyman*, se evaluó el efecto citotóxico del extracto metanólico y sus fracciones (hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol), en las células MDA-MB-231 las fracciones hexánica y clorofórmica (40 µg/ml) mostraron un mayor efecto antitumoral, mientras que en la línea MCF7, el extracto butanólico (60 µg/ml) mostró la mayor toxicidad; además el análisis fitoquímico realizado mediante HPLC reveló la presencia de distintos componentes para cada fracción, siendo la hexánica y clorofórmica, en donde se registró un mayor número de compuestos químicos (Sowmyalakshmi, *et al.* 2005).

Por otra parte, de manera interesante, observamos que el extracto hexánico de *P. edulis* genera un efecto citotóxico específico sobre las células de cáncer de mama MDA-MB-231 a la concentración de 94.63 µg/ml en los diferentes tiempos estudiados, ya que al realizar las cinéticas del efecto de este extracto con dosis desde 25 a 1000 µg/ml durante 24, 48 y 72 h sobre un cultivo primario de linfocitos y la línea celular MCF10A (correspondiente a epitelio mamario normal) observamos que únicamente al incubarse con 1000 µg/ml, detectamos una disminución en la viabilidad celular del 58 y 68% respectivamente a las 72 h

Este efecto también se ha observado, en otros estudios, por ejemplo, Stander, *et al.* 2009, reporta que el extracto acuoso de *Sutherlandia frutescens*, tiene un efecto antitumoral mayor en las células de cáncer de mama MCF7, en donde, a una dosis de 10 mg/ml generó únicamente un 26% de viabilidad celular; mientras que en la línea MCF10A, se registró un 54% de viabilidad. Asimismo Renno, *et al.*, 2008, indica que el extracto etanólico de *Orbignya speciosa* tiene un efecto citotóxico mayor en la línea celular de leucemia HL60 (IC<sub>50</sub>: 9.3 µg/ml) y de mama MCF7 (IC<sub>50</sub>: 48.8 µg/ml), a diferencia de cultivos de linfocitos (IC<sub>50</sub>: 141 µg/ml) y fibroblastos de ratón (IC<sub>50</sub>: 127 µg/ml).

Asimismo, se ha reportado que este efecto selectivo se debe a que, las células normales poseen todos sus mecanismos bien regulados, incluyendo la proliferación y los puntos de control durante el ciclo celular, a diferencia de las células cancerosas, las cuales carecen de estos puntos de control. Debido a ello, algunos estudios han observado que, las células MCF10A, las cuales son dependientes del factor de crecimiento epidermal (EGF), pueden ser capaces de evadir los efectos adversos de drogas antitumorales como el Taxol y el β-lapachol, al inducir un arresto reversible en el ciclo celular principalmente en la fase G1, a diferencia de la línea tumoral MCF-7, la cual mostró una disminución en la viabilidad celular (Li, *et al.* 2003). Más aún, esta estrategia de sobrevivencia, se ha observado en linfocitos, los cuales son capaces de evadir el efecto letal provocado por la camptotecina (Keyormasi y Pardee, 2003).

Un mecanismo similar podría explicarnos el efecto que se observó en este trabajo, en donde, las células normales (MCF10A y linfocitos) al tener bien regulados los mecanismos de control del ciclo

celular, pueden protegerse del efecto citotóxico del extracto hexánico a dosis desde 25 a 350 µg/ml; a diferencia de lo observado en las células cancerosas MDA-MB-231.

Además, algunos estudios revelan que células de cáncer de mama poseen reductasas sobre-expresadas (como la NQO1), a diferencia de células epiteliales normales. Estas reductasas activan metabolitos como las quinonas ( $\beta$ -lapachol), las cuales son reducidas al aceptar electrones, formando un intermediario inestable llamado hidroquinona; esta última promueve el inicio de un ciclo redox que involucra la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales generan un estrés oxidativo en la célula y activan la apoptosis. En contraste, en células normales se ha observado una baja expresión de estas reductasas, lo cual implica que sean menos susceptibles a la acción de quinonas provenientes de extractos de plantas (Gómez, *et al.* 2008; Pink, *et al.* 2000). En el análisis fitoquímico realizado en el extracto hexánico, se observó la presencia de metabolitos como las quinonas, estos estudios podrían explicar lo observado en los ensayos con MTT, en donde las células de cáncer de mama MDA-MB-231, fueron más sensibles al tratamiento con el extracto hexánico, a diferencia de los controles de células normales utilizados (linfocitos y línea celular MCF10A), donde la viabilidad permaneció alta con las primeras dosis administradas.

Ahora bien, para conocer el mecanismo a través del cual el extracto hexánico ejerció su efecto, se analizaron características correspondientes a la muerte celular como fueron cambios en la morfología celular, exposición de la fosfatidil serina, fragmentación del ADN y expresión de marcadores apoptóticos.

El análisis de la morfología celular nos reveló cambios importantes. Mientras que las células sin tratamiento poseían una morfología típica; las células tratadas con el extracto hexánico (94.63 µg/ml), a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h, mostraron cambios tanto en citoplasma como en núcleo, a diferencia de los controles negativos. Estos cambios incluyeron, deformación de la membrana citoplasmática, reducción del tamaño celular, deshidratación, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos; estas características se observaron a partir de las 6 h de exposición al extracto, las cuales se fueron acentuando conforme aumentó el tiempo de tratamiento. El análisis morfológico reveló que estos cambios corresponden a células en apoptosis, como se ha reportado en otros trabajos realizados al evaluar los efectos antitumorales de distintas plantas (Stander, *et al.* 2009; Zong-Fang, *et al.* 2009; Kang, *et al.* 2005).

Cabe resaltar que en el tiempo más corto (6 h) de exposición al extracto, los primeros cambios observados fueron deformación de la membrana plasmática, así como reducción del tamaño celular, lo cual concuerda con lo reportado por Kang, *et al.* 2005, donde indica que el extracto acuoso de *Coptidis rizoma* también indujo cambios morfológicos en la línea MDA-MB-231 a una dosis de 10 µg/m y un tiempo de exposición de 8 h, donde se observó una disminución de la población celular, reducción del tamaño, así como formación de cuerpos apoptóticos. Estudios

realizados en otras plantas también reportan cambios a nivel morfológico similares; Chinkuo, 2005, observó que el extracto acuoso de *S. frutesces* induce cambios en las células Caski, cuando se emplea una dosis de 3.5 mg/ml, estos cambios incrementaron conforme el tiempo de tratamiento hasta culminar en la desintegración celular.

Debido a lo anteriormente descrito concluimos que, los cambios morfológicos observados en este trabajo fueron inducidos específicamente por el extracto hexánico y muestran a su vez la inducción de una muerte celular programada como es la apoptosis en la células MDA-MB-231.

Por otro lado, para tener mayores evidencias sobre el efecto del extracto hexánico de *P. edulis* en la línea MDA-MB-231 y analizar más profundamente las características de la muerte celular que se estaba induciendo en éstas células, se llevaron a cabo ensayos de Anexina V, en donde la fosfatidil serina, que es un fosfolípido que se localiza hacia la cara interna de membrana plasmática es trasladado hacia la cara externa de la membrana cuando las células entran en apoptosis (Moreno, et al. 2000). Estos ensayos nos permitieron conocer el tipo de muerte celular inducido por el extracto. Se observó que cuando las células MDA-MB-231 son expuestas al extracto hexánico (94.63µg/ml), se activa una muerte tanto apoptótica, como necrótica, siendo la primera la más predominante. Esto se observó desde las 6 h donde el 24.8% de la población celular se encontraba en apoptosis, mientras que el 13.5% en necrosis; además la muerte celular incrementó su porcentaje hasta las 48 h analizadas en un 46.8 y 26.8% respectivamente.

Estudios realizados en otras especies de plantas muestran que el principal tipo de muerte celular que se induce es la apoptosis (Cheng-Yun, et al. 2008). Sin embargo en compuestos aislados de la familia Bignoniaceae como el  $\beta$ -lapachol se ha reportado la inducción tanto de apoptosis como necrosis en células de cáncer de mama, demostrando que la necrosis se induce de manera preferente en un 80% de las células (Li, et al. 1999).

Los resultados obtenidos de los ensayos con Anexina V muestran la evidencia de que el extracto hexánico está induciendo al menos desde el tiempo más corto estudiado, que fueron 6 h, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 cambios en la distribución de la fosfatidil serina, lo cual conlleva a la pérdida en la simetría de la membrana plasmática generando por consiguiente cambios en la permeabilidad de la célula. Estos resultados también coinciden con lo observado por microscopía de luz, en donde se analizaron deformaciones en la membrana plasmática, también desde el tiempo de exposición de 6 h con el extracto. Cabe mencionar que, en este trabajo no se analizaron tiempos más cortos de tratamiento, sin embargo, por los resultados obtenidos podemos sugerir que el extracto está actuando desde antes de las 6 h induciendo apoptosis en algunas células y que muy probablemente al ser analizadas con los ensayos de Anexina V al tiempo de 6 h, estas células ya habían entrado en un evento necrótico. Esto debido a que extractos de plantas como *Pereskia bleo* activan la apoptosis desde los 30 min de exposición en las células T47D (Tan, et al. 2005).



Otro de los procesos que se relacionan generalmente con la apoptosis es la degradación del ADN de forma específica entre nucleosomas, debido a la activación de endonucleasas que generan la fragmentación, la cual puede ser visualizada por diferentes métodos. En este trabajo se realizaron ensayos de electroforesis en geles de agarosa y TUNEL, los cuales nos permitieron analizar a las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto hexánico (94.63 µg/ml) a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Los datos indicaron que se llevó a cabo la fragmentación del ADN, la cual fue tiempo dependiente al observar en geles de agarosa fragmentos de distintos tamaños moleculares, lo cual nos indicaba la degradación internucleosomal, como respuesta a la activación de la apoptosis. Más aún, esta degradación fue visualizada también mediante los ensayos de TUNEL y permitió por un lado, corroborar el hecho de que el extracto hexánico de *P. edulis* induce la muerte celular en la línea MDA-MB-231 y por el otro, determinar la proporción de células que estaban muriendo por apoptosis en cada uno de los tiempos estudiados. Observamos que el 6.5 % de las células al tiempo de exposición de 6 h presentaban degradación del ADN, alcanzando hasta un 90% de células con dicha fragmentación a las 72 h.

Asimismo, se ha observado en otros trabajos, que extractos de plantas con efectos antitumorales inducen este patrón de fragmentación del material genético a diferentes tiempos analizados. Se ha reportado que el extracto hexánico de *Citrus grandis* induce una degradación nucleosomal a una dosis de 50 µg/ml en las células de leucemia U937, cuando son tratadas a un tiempo de 24 h (Lim, *et al.* 2009). Plantas como *Coralina pilulifera* inducen fragmentación del ADN en las células HeLa, cuando son expuestas a 150 µg/ml del extracto etanólico a las 48 h analizadas (Kwon, *et al.* 2007). Mientras que, la fracción fenólica del extracto de *Duchesnea indica*, promueve este patrón de fragmentación en células HeLa, cuando se administra una dosis de 40 µg/ml durante 72 h (Peng, *et al.* 2009).

Por lo tanto, los ensayos que se realizaron en este estudio nos permiten afirmar que el extracto hexánico tiene un efecto al activar de manera importante la muerte celular programada en la línea de cáncer de mama en estudio.

La apoptosis es un mecanismo que puede ser activado principalmente mediante dos vías, una extrínseca, la cual esta mediada por receptores de la familia TNF; y una intrínseca, en donde participa de manera fundamental la mitocondria. Se sabe que en ambas vías se lleva acabo la participación de unas proteasas conocidas como caspasas. Éstas pueden ser de dos tipos: iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9), pueden activar a otras caspasas rio abajo; mientras que las efectoras (caspasa 3), son responsables directamente de la activación de la apoptosis al cortar proteínas estructurales y nucleares importantes para el mantenimiento celular (Degterev, *et al.* 2003; Fulda y Debatain, 2006; Ghrobial, *et al.* 2008).

Debido a las evidencias obtenidas en este estudio, en donde se muestra que las células MDA-MB-231 expuestas al extracto hexánico entran en un proceso de muerte celular que es la apoptosis, se

decidió evaluar la expresión y activación de las caspasas 8, 9 y 3, para conocer las vías involucradas en la activación de la apoptosis en las células en estudio como efecto de su exposición al extracto hexánico (94.63 µg/ml). Los resultados obtenidos mostraron que la procaspasa 8, mantiene su expresión constante a lo largo de los distintos tiempos estudiados del tratamiento en las células MDA-MB-231, al igual que en los controles utilizados; lo cual indicó que la vía extrínseca no estaba siendo activada. Por otra parte, en el caso de la procaspasa 9, se observó que en las células expuestas al extracto hexánico hubo una disminución de la expresión de ésta, a partir de las 6 h de tratamiento, sugiriendo la activación de la misma, así como con el control positivo. Por otro lado, cuando se evaluó la expresión de la caspasa 3, también se observó que en las células tratadas con el extracto hexánico, aumentó la expresión de ésta, comenzando a detectarse desde las 6 h y alcanzando su máxima expresión a las 48 h, a diferencia de los controles negativos.

Estos resultados indicaron que el extracto hexánico de *P. edulis* activa la vía intrínseca o mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231. Para ello, una vez que la caspasa 9 ha sido activada, mediante su unión al citocromo c y al factor Apaf-1, esta caspasa es la responsable de cortar y activar a la caspasa 3, la cual, a su vez es la encargada de cortar proteínas del citoesqueleto y del núcleo, así como algunas DNAsas para inducir la fragmentación del ADN y por lo tanto inducir la apoptosis y con ello, observar las características morfológicas típicas de la muerte celular que analizamos en los ensayos.

Esta vía de activación ha sido reportada en diferentes células como respuesta a la exposición de extractos o compuestos aislados de plantas con efecto antitumoral. Se ha observado que el extracto etanólico de *Chrysanthemum indicum* (Zong-Fang, *et al.* 2009) induce la activación de la caspasa 3 y 9 así como la liberación del citocromo c en células de hepatocarcinoma HCC. También se ha reportado la activación de esta vía en células HeLa, las cuales han sido expuestas al extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* a una dosis de 2 mg/ml durante 24 h (Martino, *et al.* 2006); al extracto etanólico de *Corralina pilulifera*, a dosis desde 50- 200 µg/ml durante 48 h (Kwon, *et al.* 2007), o bien, a la fracción fenólica del extracto de *Duchesnea indica*, a dosis de 20- 160 µg/ml durante 24 h de tratamiento (Peng, *et al.* 2008). Por su parte, estudios realizados en la línea celular MDA-MB-231, han mostrado que la prismaiterina, un triterpeno aislado de *Reissantia buchananii*, induce la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis desde tiempos de tratamiento de 6 hasta 18 h, cuando son tratadas con dosis de 1 y 3 µM, (Chin-Chung, *et al.* 2005), de igual forma, cuando las células son expuestas al extracto acuoso de *Cordyceps militaris*, a una concentración de 0.2- 0.8 µg/ml durante 24 h (Cheng-Yun, *et al.* 2008), se induce la activación de la apoptosis observando un aumento en la expresión de proteínas como Bax, citocromo c, caspasa 9 y 3 y corte proteolítico de PARP. Estos estudios nos indican que la vía de activación intrínseca es la que se activa con mayor frecuencia en células de cáncer tratadas con extractos o metabolitos aislado de plantas con actividad antitumoral.

Ahora bien, el estudio fitoquímico preliminar realizado nos indicó que las familias de metabolitos presentes en el extracto hexánico fueron terpenos, cumarinas y quinonas, como se ha reportado para árboles de la familia Bignoniaceae (Daniel, 2006). Estos datos son interesantes ya que algunos autores han evaluado el efecto citotóxico de estos metabolitos en distintas líneas celulares de cáncer observando un efecto antitumoral de manera dosis dependiente. Por ejemplo, se ha reportado que algunos monoterpenos como el geraniol, carvanol y limoneno, promueven en un 80% la regresión de tumores en modelos murinos de cáncer de mama, actuando de forma quimiopreventiva (Gould, 1995). La presencia de triterpenos en plantas con efectos antitumorales, también ha sido de gran eficacia, algunos como el nimbolide o betulina aislados de *Azadirachta indica* inducen la apoptosis mediante la activación de moléculas como p53, Fas, Bad y citocromo c, así como arresto en el ciclo celular y disminución de la proliferación en líneas celulares como HL.60, U397, B16, entre otras (Comera, *et al.* 2010).

Por otra parte, las cumarinas como la esculetina, dafneteína, escopoletina y 7 hidroxycumarina, han mostrado un potente efecto antitumoral en las líneas celulares de cáncer HL60, A498, HeLa y Calo, su actividad indujo un arresto celular en la fase G0, además de cambios morfológicos y activación de la apoptosis (Xue-Li, *et al.* 2001., Finn, *et al.* 2001; Finn, *et al.* 2002)

Asimismo, se ha reportado que las quinonas como la doxorubicina, mitomicina c y  $\beta$ -lapachol, poseen un efecto citotóxico en células de cáncer. Algunos estudios revelan que la estructura de las quinonas tiene la habilidad de aceptar electrones y estimular la producción intracelular de radicales libres y especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Gómez, *et al.* 2008), lo cual provoca un estrés celular y la subsecuente activación de mecanismos de muerte celular como es la apoptosis. Además se ha reportado que árboles de la familia Bignoniaceae, son fuente importante de quinonas como el lapachol y sus derivados ( $\beta$  y  $\alpha$ -lapachol), los cuales han mostrado tener un potente efecto anticancerígeno a nivel clínico, principalmente para el tratamiento del cáncer de mama, ovario y laringe (Gómez, *et al.* 2008; Huang y Pardee, 1999; Steves-Souza, *et al.* 2007).

Por lo tanto, estos estudios nos indican que, la presencia de dichos metabolitos en el extracto hexánico están involucrados con la actividad citotóxica que se encontró en el presente estudio. Y que por lo tanto la actividad sinérgica o individual de los metabolitos están involucrados con la activación de la apoptosis.

Finalmente, en conjunto los resultados obtenidos del presente trabajo dan evidencias claras de que el extracto hexánico de *P. edulis* induce la muerte de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, siendo principalmente una muerte celular programada como lo es la apoptosis. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para identificar el o los componentes presentes en esta planta, los cuales están generando esta actividad, además de probar en otras líneas celulares su efecto, así como en modelos animales para obtener evidencias celulares y moleculares que permitan en un futuro poder desarrollar un nuevo tratamiento con acción antitumoral.

## 7. CONCLUSIONES

- El extracto hexánico tuvo el mayor efecto antitumoral en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, obteniendo un valor  $IC_{50}$  de 94.63  $\mu\text{g/ml}$ .
- El extracto hexánico no mostró un efecto citotóxico en cultivos primarios de linfocitos y en la línea celular de epitelio mamario MCF10A a dosis de 25 a 350  $\mu\text{g/ml}$ .
- Además, el extracto hexánico indujo una muerte de tipo apoptosis y necrosis, siendo la primera la de mayor porcentaje en las células MDA-MB-231.
- Como resultado de la activación de la apoptosis, las células de cáncer de mama mostraron cambios en la morfología celular, fragmentación del ADN y expresión de las caspasas 3 y 9, activándose la vía intrínseca o mitocondrial a partir de las 6 h hasta las 72 h de tratamiento.
- Los metabolitos presentes en el extracto hexánico involucrados en la actividad antitumoral mostrada, correspondieron a la familia de terpenos, cumarinas y quinonas.

## 8. PERSPECTIVAS

- Analizar otros marcadores de muerte celular como Bax, Bad, Bcl-2 y citocromo c, con la finalidad de corroborar la activación de la vía intrínseca como efecto de la exposición del extracto hexánico en la línea MDA-MB-231. Así como el efecto del extracto sobre el ciclo celular.
- Realizar técnicas como microscopía electrónica para evaluar de manera más detallada el efecto del extracto a nivel morfológico.
- Evaluar el efecto del extracto hexánico en distintas líneas celulares de cáncer de mama y de otro origen.
- Realizar un análisis fitoquímico mediante HPLC, para conocer los metabolitos presentes en el extracto hexánico, los cuales están siendo responsables de su efecto, así como su análisis por separado.
- Evaluar la actividad del extracto hexánico en un modelo murino de cáncer de mama para saber como actúa el extracto hexánico al interactuar con diferentes células.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alfaro, E. M., C. García y A. Dueñas. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología* 46(4): 275-280
2. Bailly, C. 2009. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical pharmacology*, 77:1447–1457.
3. Barquero, A. 2007. Plantas sanadoras: Pasado, Presente y Futuro. *Química viva* 2: 53-69.
4. Chatelain, K., S. Phippen, J. McCabe, C. A. Teeters, S. O'Malley y K. Kingsley. 2008. Cranberry and Grape Seed Extracts Inhibit the Proliferative Phenotype of Oral Squamous Cell Carcinomas. *eCAM* 1- 12pp.
5. Chen, M. y J. Wang. 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7: 313–319.
6. Cragg, G. M. y D. J. Newman. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.*, 77(1):7–24.
7. Cregan, S.P., A Fortin., J. G. MacLaurin., S. M. Callaghan., F. Cecconi., S. W. Yu., T. M. Dawson., V. L. Dawson., D. S. Park., G. Kroemer y R. S. Slack. 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol*, 158 (3):507-517.
8. Daniel, M. 2006. *Medicinal Plants, Chemistry and Properties*. Science Publishers. E.U.A 250pp.
9. Debnath, J., K. Muthuswamy y J. Brugge. 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30:256-268
10. Degterev, A., M. Boyce y J. Yuan 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543–8567.
11. Deveraux, Q. L., Roy N., Stennicke H R, Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S. M, Alnemri E. S., Salvesen G.S. y J .C. Reed.1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 17(8): 2215–2223.
12. De Vita, V., S. Hellman y S. A. Rosenberg. 2001. *Cáncer, Principios y Práctica de Oncología*. Volumen 1. 5ª Edición. Ed Médica Panamericana. Madrid, España. 1540pp.
13. Dubin, M. y A. O. Stoppani. 2000. Muerte celular programada y apoptosis, función de las mitocondrias. *Medicina* 60: 375-386.
14. Elluru, S., J. P. Doung, B. Wootla, F. Prost, V. Negi y S. Kaveri. 2007. Tumor regressive effects of *Viscum album* preparations. Exploration of immunomodulatory mechanisms. *Med*; 67 (Supl. II): 85-89.
15. Fan, T. J., L.H. Han., R. S. Cong y J. Liang. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(11): 719–727.
16. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandennebee P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757:1371-1387.
17. Fulda, S. y K. M. Debatin. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811
18. García, G. V., M. A. González y A. Bascones.2006. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. *Resultados Av Odonto*, 22 (5):263-269.
19. Garcia, M., A. Jemal, E. M. Ward, M. M. Center, Y. Hao, R. L. Siegel y M. J. Thun. 2007. *Global Cancer Facts & Figures*. Atlanta, GA: American Cancer Society. 52pp.
20. Gachet, M.S., Schühly,W., 2008. Jacaranda—An ethnopharmacological and phytochemical review. *J. Ethnopharmacol*. doi:10.1016/j.jep.2008.10.015
21. Ghobrial, I.M., T. E. Witzig y A. A. Adjei. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55:178-194.
22. Gómez, J. R., J. M. Prieto y M. Heinrich. 2008. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*). A global ethnopharmacological commodity?. *Journal of Ethnopharmacology*, doi:10.1016/j.jep.2008.10.004
23. Gorczyca, W., Bedner, E., Burfeind, P., Darzynkiewicz, Z y M.R. Melamed.1998. Analysis of apoptosis in solid tumors by laser-scanning cytometry. *Mod. Pathol*. 11(11):1052-8

24. Graham, J. G., M. L. Quinn, D. S. Fabricant y N. R. Farnsworth. 2000. Plants used against cancer, an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* 73:347–377
25. Hanahan, D. y R. A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57–70.
26. Hernández, E., A. Aguilar, L. Aguilar, R. Roman, A. A. Chávez, L.M. García y J.L. Flores. 2002. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 45: 118-124.
27. Hu, Q., J. Chang., L. Tao., G. Yan., M. Xie y Z. Wang. 2005. Endoplasmic reticulum mediated necrosis-like apoptosis of Hela cells induced by Ca<sup>2+</sup> oscillation. *J. Biochem Mol Biol.* 38 (6):709-716
28. Hussain, H., K. Krohn, V. U. Ahmad, G. A. Miana y I. R. Greend. 2007. Lapachol: an overview. *ARKIVOC* 2:145-171
29. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2008. Reporte: Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales.
30. Jackson, S.J., P.J. Houghton., S. Retsas y A. Photiou. 2000. In vitro cytotoxicity of norviburtinal and isopinnatal from *Kigelia pinnata* against cancer cell lines. *Planta Med*, 66(8):758-61
31. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
32. Juscafresca, B. 1995. *Guía de la Flora Medicinal*. Ed Aedos. México. 250pp.
33. Kang, J., J. Liu., J. Wang., C. He y F. Li. 2005. The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26(11):1934-1939.
34. Keyomarsi, K y A. B. Pardee. 2003. Selective protection of normal proliferating cells against the toxic effects of chemotherapeutic agents. *Progress in Cell Cycle Research*, 5:527-532.
35. Kim, R., M. Emi., K. Taname. 2005. Caspase-dependente and independent cell death pathways alter DNA damage (Review. *Onc. Rep.*, 14:595-599.
36. Kolodziej, H. 1997. Protective role of *Kigelia africana* fruits against benzo(a)pyrene-induced fore-stomach tumourigenesis in mice and against albumen-induced inflammation in rats. *Pharm Pharmacol* 2/3: 67 – 70
37. Laza, L. D., L. I. Rodríguez y C. G. Sardiña. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Med* 8 (3).
38. Lazcano, A. H. 2000. *Cáncer Cervino uterino. Prevención diagnóstico y control*. Ed Médica Panamericana. 254pp.
39. Lewin B. 2008. *Genes IX*. 6 ed. New York: Oxford University. 892pp.
40. Lewin, B., L. Cassimeris, V. R. Lingappa y G. Plopper. 2007. *Cells*. 863pp.
41. Li, Z., Z. Wang., Y. Ji., S. Zhang., C. Huang., J. Li y X. Xia. 2009. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with *Chrysanthemum indicum* extract. *World J Gastroenterol.* 15(36): 4538-4546
42. Lim, H., J. Moon., H. Ki., M. Cho y S. Cho. 2009. Induction of apoptosis an U937 human leukaemia cells by hexane fraction of an extract of immature *Citrus grandis* Osbeck fruits. *Food Chemistry*, 114:1245-1250.
43. Linares, D., R. Bye y B. Flores. 1999. *Plantas medicinales de México usos, remedios y tradiciones*. Instituto de Biología. UNAM. México. 155 pp.
44. Lodish, H., B. Arnold, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2002. *Biología Celular y Molecular*. 4ª edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 1084pp.
45. Loyola, V. y F. Vazquéz. *Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols*. 2a edición. Ed. Humana Press Inc. E.U.A. vol. 318
46. Macdonlad, F., C. H. Ford y A. G. Casson. 2004. *Molecular Biology of Cancer*. 2ª edición. BIOS Scientific Publishers. E. U. A. 256pp.
47. Moura, M. D., J. Sousa., R. A. Guerra, M. F. Formiga y J. M. Barbosa. 2002. Natural Products Reported as Potential Inhibitors of Uterine Cervical Neoplasia. *Acta Farm. Bonaerense* 21(1):67-74.
48. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. DOF – 17 de septiembre de 2003, México

49. Ofir, R., R. Seidman., T. Rabinski., M. Krup., V. Yavelsky., Y. Weinstein y M. Wolfson. 2002. Taxol inducel apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinomas cells is caspase-3 and caspase-9 independent.
50. Ordaz y Maldonado, 2009. Personal
51. Organización Mundial de la Salud. 2008. Cáncer. Nota Descriptiva 297.
52. Orozco, E. y P. V. Gariglio. 2000. Genética y Biomedicina Molecular. Ed. Limusa Noriega Editores. México. 348pp.
53. Pennington, T. D. y J. Sarukhan. 2005. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM.
54. Peng, B., Q. Hin., X. Liu., L. Wang., Q. Chang, J. Li., J. Tang., N. Wang y Y., Wang.2009. Duchesnea phenolic fraction inhibits in vitro and in vivo growth of cervical cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Exp. Biol. Med.*, 234:74-83
55. Pérez, R. M., C. Pérez, M. A. Zavala, S. Pérez-Gutiérrez. 1998. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardiaterniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud pública de méxico*, .40 (4):354-358.
56. Pérez, R. M, C. Perez, M. A. Zavala, S. Perez, H. Hernandez y F. Lagunas. 2000. Hypoglycemic effects of lactucin-8-O-methylacrylate of *Parmentiera edulis* fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 71:391–394.
57. Pink, J.J., S. M. Planchon., C. Tagliarino., M. E. Varnes, D. Siegel y D. A. Boothman. 2000. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Activity Is the Principal Determinant of b-Lapachone Cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8)5416–5424.
58. Pushkarev, V. M., D. V. Starenki, V. A. Saenko, H. Namba, J. Kurebayashi, M. D. Tronko y S. Yamashita. 2004. Molecular Mechanisms of the Effects of Low Concentrations of Taxol in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Endocrinology* 145(7):3143–3152.
59. Ratain, M. J., M. Tempero y C. Skosey. 2001. Outline of oncology therapeutics. E.U. A. 266pp.
60. Ravindranath, M. H., T. S. Saravanan, C.C. Monteclaro, N. Presser, X. Ye, S. R. Selvan y S. Brosman. 2006. Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. *eCAM* 3(2)237–247.
61. Renno, M., G. Barbosa., P. Zancan., V. Veiga., C. Alviano., M. Sola-Penna., F. Menezes y C. Holandino. 2008. Crude ethanol extract from babassu (*Orbignya speciosa*); cytotoxicity on tumoral and non-tumoral cell lines. *An. Acad Bras Cienc*, 80(3):1-14
62. Rita, M. P., D. Ávila, R. Edgill, Y. Colon, W. Quesada, J. L. Bello; y C. Panfet. 2005. Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana* L. *Rev Cubana Plant Med* 10(3-4).
63. Rosales, R., M. de la Garza, C. Arias-Castro, M. Rodríguez-Mendiola, S. Fattel-Fazenda, E. Arce-Popoca, S. Hernández-García y S. Villa-Treviño. 2008. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *J Ethnopharmacol.*115(3):381-6.
64. Rzedowsky, G. C. y J. Rzedowsky. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Patzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
65. Sa, F., J. Gao., K. F. Fung., Y. Zheng, S. M. Lee y Y. T. Wang. 2008. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines. *Chemico-Biological Interactions* 171:1–14
66. Sebastian K. S y R. V. 2007. Thampan Differential effects of soy bean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells. *Chemico-Biological Interactions* 170: 135–143.
67. Segal, E. B., C. Dudognon., J. Mathieu., J. Hillion y F. Bensacon. 2005. Cell death signalling: recent advances and therapeutic application. *Cancer* 92 (1) : 23-35
68. Schönthal, A. H. 2008. Checkpoint Controls and Cancer. Volume 2. Activation and Regulation Protocols. Ed Humana Press. 333pp.
69. Shi, Y. 2004. Caspase Activation:Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell* 117: 855–858.
70. Sowmyalakshmi, S., A. Nur-e-Alam., MA. Akbarsha, S. Thirugnanam y D. Chendil. 2005. Investigation on Semecarpus Lehyam—a Siddha medicine for breast cancer. *Planta*, 220: 910–918



71. Sorela, B. J. 2006. Cuajilote (*Parmentiera edulis*). *Tlahui-Medic* 21.
72. Stander, A., S. Marais., V. Stivaktas y C. Vorster. 2009. In vitro effects of *Sutherlandia frutescens* water extracts on cell numbers, morphology, cell cycle progression and cell death in a tumorigenic and a non. tumorigenic epithelial breast cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 124:45-60
73. Steves-Souza, A., D. V. Figueiredo, A. Esteves, C. A. Câmara, M. D. Vargas, A. C. Pinto, y A. Echevarria. 2007. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA Lapachol amine derivatives: cytotoxic and DNA-topo effects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 1399-1402.
74. Sunila, E. S. y G. Kuttan. 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine *Journal of Ethnopharmacology* 90: 339–346.
75. Syntichaki, P. y N. Tavernarakis. 2002. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?. *EMBO reports* 7(3): 604-609.
76. Tan, M. L., S. F. Sulaiman., N. Najimuddin, M. R. Samian, T.S. Tengku. 2005. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 287–294
77. Tangke, E., B. Dani., Y. Ayupriyanti., I. Wijaya., D. Yulia y F. Sandra. 2009. Anticancer properties of diethyleter extract of wood from sukun (*Artocarpus altilis*) in human breast cancer (T47D) cells. *Trop Jou Phar Res*, 8(4):317-324.
78. Thliamplam, UM., U. R. Kuppusamy., M. S. Kanthimathi y C. Wiart. 2006. Comparison between the effects of *Syzygium jabolatum* leaf and fruit extracts on estrogen positive and estrogen negative breast cancer cell lines. *Int Jou Mol Med and Ad Sci*, 2(2)236-238.
79. Trease, G. E. y W. C. Evans. 1986. *Tratado de Farmacognosia*. 12a ed. Ed. Interamericana. E. U. A. 846 p.
80. Wang, T., H. Wang y Y. Soong. 2000. Paclitaxel-Induced Cell Death, Where the Cell Cycle and Apoptosis Come Together. *Cancer*, 88(11):2619-2628.
81. Weinberg, R. A. 1996. How Cancer Arises. *Sci Am*;62-70.
82. Weiss, G. R. 1997. *Oncología Clínica*. Ed El Manual Moderno, S. A de C.V. México, D.F. 542pp.
83. WHO. 2002-2005. *Tradicional Medicine Strategy*. 74pp.
84. WHO. 2000. *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. 74pp.
85. Wu, S. J., L.T. Ng, D. L. Lin, S. N. Huang, S. S. Wang y C. C. Lin. 2004. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Letters*, 215( 2):199-208.
86. Ye, X., R. L. Krohn, S. S. Joshi, C. A. Kuszynski, T. R. McGinn, M. Bagchi, H. G. Preuss, S. J. Stohs y D. Bagch. 1999. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 196: 99–108.
87. Zhang, Y. y B. Bhavnani. 2005. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *Neuroscience* 6 (13):1-23.

## ANEXO I

### Reveladores para Cromatografía en Capa Fina.

#### a) Sulfato Sérico Amoniacal - Ácido Sulfúrico

Reactivo: 350 g de hielo se mezclan con 12 g de Sulfato Sérico Amoniacal y se le adicionan 22.5 ml de Ácido Sulfúrico concentrado. Se calienta en Baño Maria hasta que se disuelva completamente el compuesto. Posteriormente se filtra.

Procedimiento: Rocíar la placa con la solución y calentar a 100°C.

Resultados: detección de compuestos en general o no, produciendo manchas.

#### b) Yodo

Reactivo: Cristales de yodo.

Procedimiento: Colocar la placa en un frasco cubierto que contenga cristales de yodo.

Resultados: Algunos compuestos adsorben yodo reversiblemente produciendo manchas de tonos amarillos a cafés. Útil para detectar ácidos grasos insaturados.

#### c) 2,4-Dinitrofenilhidrazina

Reactivo: Disolver 0.3 g de 2,4 dinitrofenilhidrazina en 100 ml de ácido sulfúrico 2 N.

Procedimiento: Rocíar

Resultados: Manchas de rojo a amarillas. Se usan para identificar aldehídos y cetonas.

#### d) Agente de Dragendorff – Modificación Munier

Reactivo: Solución A: Disolver 1.7 g de subnitrito de bismuto y 20 g de ácido tartárico en 80 ml de agua. Solución B: Disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 ml de agua. Mezclar partes iguales de la solución A y solución B. Estable aproximadamente un mes.

Procedimiento: El reactivo a rociar es preparado mezclando 5 ml de la mezcla con una solución de 10 g de ácido tartárico en 50 ml de agua. Estable por una semana.

Resultados: Para detección de alcaloides, manchas rojas

#### e) Cloruro férrico – ferrocianuro de potasio

Reactivo: Solución A: Cloruro férrico 0.1 M. Solución B: Ferrocianuro de potasio 0.1 M.

Solución a rociar: Preparar una mezcla 1:1 de la solución A con la solución B.

Procedimiento: Rocíar. Puede ponerse a calentar la placa a 110°C.

Resultados: Las aminas aromáticas producen manchas oscuras (pudiera tenerse también en última instancia un tono azul claro). Detecta fenoles y esteroides fenólicos.

#### f) Vainillina – Hidróxido de Potasio

Reactivo: Solución A: Vainillina 2% en *n*-propanol. Solución B: Hidróxido de potasio 1% en etanol.

Procedimiento: Rocíar con A y calentar a 110°C por 10 min, observar bajo la luz U.V. en onda corta. Rocíar con B y calentar otra vez.

Resultados: Detecta aminoácidos y aminas. Después rociar con A, la ornitina exhibirá un amarillo – verde brillante y la lisina una débil fluorescencia amarillo – verde. Después rociar con B, la ornitina posee un color salmón que se destañará; la prolina, la hidroxiprolina, el ácido pipercolínico, y la sarcosina virará a un color rojo después de unas cuantas horas. La glicina producirá una mancha café-verde y otros aminoácidos se tornarán a un café débil (péptidos, proteínas y enzimas).

#### g) Reactivo citrobórico

Reactivo: 5 g de ácido bórico y 5 g de ácido cítrico en 100 ml de etanol.

Procedimiento: Rocíar la placa con la solución y calentar a 100°C durante 5 min y observar a luz UV. Resultados: detección de flavonoides.

#### h) Reactivo Vainillina- Ácido sulfúrico

Reactivo: Solución A: ácido sulfúrico al 5% en etanol. Solución B: Vainillina al 1% en etanol.

Procedimiento: Rocíar la placa con la solución A, luego con la B y calentar a 110°C por 5 – 10min.

Resultados: detección de saponinas, coloración azul o azul violeta, algunas pueden dar amarillo.

**i) Reactivo de Borntrager**

Reactivo: NaOH al 5% en agua. Procedimiento: rociar la placa con la solución y calentar.

Resultados: detección de derivados antracénicos libres, las antraquinonas dan coloración roja en luz visible; las antronas y antrones dan coloración amarilla en luz visible y fluorescencia amarilla en UV-365nm.

**j) Reactivo Hidróxido de Potasio**

Reactivo: Hidróxido de potasio al 55 en etanol. Procedimiento: Rociar la placa con la solución.

Resultados: detección de cumarinas volátiles, las zonas muestran una fluorescencia azul.

**k) Revelador Liebermann-Buchard**

Reactivo: 5 ml de anhídrido acético y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado se agregan cuidadosamente a 50 ml de etanol absoluto, mientras se enfría en baño de hielo. El reactivo debe de estar recién preparado.

Procedimiento: rociar la placa y calentar. Resultados: detección de triterpenos y esteroides

## ANEXO II

### Pruebas fitoquímicas cualitativas

#### a) Azúcares reductores

Tomar 2 ml de muestra, colocar en un tubo de ensayo y ajustar a un pH 11 con hidróxido de sodio al 5%, de aquí tomar 0.5 ml de muestra y colocar en un segundo tubo. Colocar los tubos en baño María por 16 min.

**Prueba 1.** Agregar 0.5 ml de solución A y 0.5 ml de solución de Fehling más 1ml de agua. La prueba es positiva con un precipitado color naranja o rojo ladrillo

**Prueba 2.** Adicionar 0.5 ml de reactivo de Benedict y 1ml de agua. La prueba es positiva con un precipitado color naranja o rojo ladrillo

#### b) Alcaloides

Tomar 5 ml de la solución filtrada de cada uno de los extractos y agregar 10 ml de ácido clorhídrico al 10%, calentar a ebullición por 5 min, enfriar y filtrar. Posteriormente colocar 1ml del filtrado claro y transparente en tubos, además del testigo

**Prueba 1.** Agregar una gota de reactivo Dragendorff. Prueba positiva con precipitado naranja.

**Prueba 2.** Agregar una gota del reactivo Wagner. Prueba positiva con un precipitado café a naranja

#### c) Flavonoides

Tomar 0.5 ml de cada muestra y diluir en etanol hasta un volumen de 2 ml.

**Prueba 1.** Agregar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y observar presencia de coloración; posteriormente agregar un tozo de magnesio metálico. la prueba da positiva para la presencia de auronas o charconas con coloración roja; y presencia de flaonas, flavonoles y flavononas con coloraciones de naranja a magenta.

**Prueba 2.** Adicionar tres gotas de hidróxido de sodio al 10%. la prueba es positiva para presencia de xantonas y flaonas con coloración de amarillo a rojo, flavonoides con coloración de café a naranja, antocioninas de color azul y charconas de color púrpura a rojizo.

#### d) Saponinas

**Prueba 1.** Colocar 1 ml de muestra, más 1 ml de agua y agitar vigorosamente. La prueba da positiva cuando aparece espuma, medir la altura de la espuma la cual debe de ser estable durante 30 min.

**Prueba 2.** Colocar 0.5 ml de muestra y concentrar hasta 0.2 ml, agregar 2 gotas de anhídrido acético y luego 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. La prueba da positiva para

presencia de saponinas esferoidales cuando aparecen coloraciones azul o verde; y presencia de saponinas triterpenoides cuando da coloraciones rosa, rojo, magenta o violeta.

**Prueba 3.** Concentrar 0.5 ml de muestra hasta aproximadamente 0.1 ml, agregar 2 gotas de reactivo de Rosenthaler y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, la prueba da positiva para saponinas triterpenoides cuando se forma una coloración violeta.

#### **e) Taninos**

A 1ml de los extractos obtenidos se le agregaron 2 ml de agua y 3 gotas de cloruro de sodio 2%, se calentó a ebullición por 1 minuto y se enfriaron las soluciones.

**Prueba 1.** Agregar 2 gotas de reactivo de gelatina, es positiva si se forma un precipitado blanco

**Prueba 2.** Agregar 1 gota de reactivo de cloruro férrico al 1%, posteriormente agregar 1 gota de ferrocianuro de potasio al 1%. la prueba da positiva cuando aparecen coloraciones de azul a negro (ácido gálico), verde (derivados de catecol) y azul (compuestos fenólicos).

#### **f) Cumarinas**

Se pesó 0.1 g de muestra, se le agregó 5 ml de etanol, se calentó y se diluyó a 5 ml.

**Prueba 1.** A la muestra se le adicionó 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado, dando positiva la prueba con la presencia de color azul a violeta.

#### **g) Quinonas**

En una cápsula de porcelana se colocaron 2 ml de la muestra, se llevó a sequedad y el residuo se dividió en muescas de porcelana.

**Prueba 1.** Se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado, la prueba es positiva si muestra una coloración roja indicando la presencia de antraquinonas.

#### **h) Glicósidos cardiotónicos**

En una cápsula de porcelana se transfirieron 2 ml de muestra y se concentró a la tercera parte de su volumen original, después se dividió y se coloraron en otras muescas de porcelana.

**Prueba 1.** La muestra se dejó evaporar y se le adicionó 3 gotas de piridina y una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y posteriormente 4 gotas de hidróxido de potasio, la prueba es positiva si aparece una coloración roja.

**Prueba 2.** Se agregaron 3 gotas del reactivo de Baljet, si es positiva da una coloración naranja a rojo oscuro.

#### **i) Sesquiterpenlactonas**

Se colocó una porción de la muestra en una cápsula de porcelana y se agregaron 2 gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol, se calentó la mezcla hasta ebullición por 2 minutos y se dejó enfriar, se llevó a pH 1 y finalmente se agregó 1 gota de cloruro férrico al 1%, para una prueba positiva se observa una coloración roja, violeta o rosa.