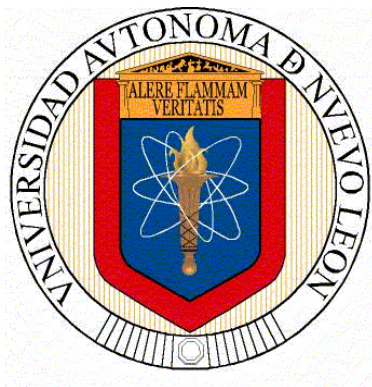


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO CITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO DE
Cuphea aequipetala, SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER Y UN MODELO
MURINO.**

Por

ASHANTI CONCEPCIÓN USCANGA PALOMEQUE

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGIA

Noviembre, 2014.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por siempre estar conmigo y permitirme concluir este trabajo. Les doy las gracias a mis padres por todo su apoyo, por creer en mí y tener paciencia y dejarme tomar mis propias decisiones.

Agradezco a Brenda, por ser tan paciente y estar a mi lado siempre, sé que no es fácil soportar mi mal genio, pero nunca te has hecho a un lado y has estado en las buenas y en las malas, gracias por tu cariño. También agradezco a Gris y Paola porque a pesar de tener vidas tan diferentes, tan ocupadas, siempre nos dábamos tiempo para charlar y sacar todos nuestros traumas.

Le doy las gracias a mi tía Irma, mi tío Juan y a toda su familia por abrirme las puertas de su hogar y preocuparse por mí. De igual forma agradezco a mi tía Socorro, mi tío Javier y mi tía Blanca, por querer verme siempre y animarme a seguir adelante. A mis primos que ya son todos unos Ingenieros y a cada paso están conmigo en mi corazón y pensamiento.

Mis hermanos de ciencia Beto, Mariel y aunque estés en otra área Laura, sin ustedes no me sentiría tan presionada por terminar, gracias por su ayuda y por compartir sus reactivos y material, son los mejores, nunca dejen de esforzarse, sigan siendo un buen ejemplo en este ámbito científico, los quiero y admiro mucho.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del L5, qué sería yo sin sus conocimientos y ayuda, gracias por ser pacientes, en especial Santiago, Karina, Fer y Edgar, además de los peques, Liz, Evelyn, Deby, Zacarías, Pecina y a cada miembro del laboratorio y de los laboratorios vecinos, en especial a Karlita, Cinthia, Manuel, Salome y todo el LIV.

De manera especial quiero agradecer al Dr. Pablo Zapata, por su gran apoyo, sus vastos conocimientos, por creer en mí, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y por ser el director de este proyecto, sin él, nada sería posible, de la misma forma agradezco a la Dra. Carolina que me apoyo mucho en el área de citometría entre otros, fue un placer para mí trabajar con usted, también agradezco a mi comité de tesis, los Doctores, Moisés Franco y Edgar, las Dras. Laura Trejo y Lydia Rivera, por aceptar ser parte de este trabajo.

Agradezco a CONACyT por brindarme, a través de su beca, la valiosa oportunidad de cursar una etapa más que ha enriquecido satisfactoriamente en mi persona. Así mismo agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, por abrirme sus puertas una vez más a esta inolvidable experiencia.

De igual manera le doy gracias a la Facultad de Ciencias Biológicas por su contribución en mi formación tanto profesional como personal; por fomentar y alentar la participación en Congresos y Seminarios dentro y fuera de nuestra institución, así mismo le doy gracias por su apoyo brindado a través de su beca de cuota interna y de rectoría.

DEDICATORIA

A mis padres

ÍNDICE

Sección	Página
Portada	
Comité de tesis	
Agradecimientos	I
Dedicatoria	III
Índice	IV
Índice de Tablas	VIII
Índice de Figuras	IX
Lista de Símbolos y Abreviaturas	XV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
➤ Generalidades del cáncer	3
➤ Características del cáncer	3
➤ Epidemiología de cáncer a nivel mundial	4
➤ Cáncer en América	5
➤ Cáncer en México	5
➤ Medicina alopática contra el cáncer	5
❖ Escisión quirúrgica	5
❖ Quimioterapia	6
❖ Radioterapia	7
❖ Terapia hormonal	7
❖ Inmunoterapia	9
➤ Otros tratamientos	9
➤ Medicina Alternativa y Complementaria	10
➤ Plantas medicinales. Tradición herbolaria	11
➤ Las plantas como fuentes de compuestos anticáncer	12
➤ Extractos de plantas con actividad citotóxica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	18

➤ Generalidades de la hierba del cáncer (<i>Cuphea aequipetala</i>)	20
❖ Aspecto etnobotánico y etnomédicos	20
❖ Aspectos químicos y farmacológicos	22
➤ Muerte celular	23
➤ Tipos de muerte celular programada	23
➤ Necroptosis	25
➤ Piroptosis	25
➤ Paraptosis	25
➤ Genes de proliferación y muerte	26
❖ Gen <i>p53</i>	26
❖ Genes <i>bcl-2</i>	26
❖ Gen del tumor de Wilms (<i>wt1</i>)	27
➤ Angiogénesis	29
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
➤ Líneas celulares	34
➤ Material Vegetal	34
➤ Obtención del extracto acuoso	34
➤ Obtención del extracto metanólico	35
➤ Ensayos <i>in vitro</i>	35
❖ Análisis morfológico de las células tratadas con los extractos, empleando el microscopio invertido	35
❖ Ensayo de citotoxicidad	35
❖ Determinación de la CC ₅₀ del extracto acuoso y metanólico en las diferentes líneas celulares de cáncer	36
❖ Obtención de células mononucleares de sangre periférica	38
❖ Ensayo clonogénico	38
❖ Ensayo de la fragmentación del ADN	39

❖ Determinación de la condensación nuclear por medio de la tinción de Hoescht	39
❖ Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo usando annexina y yoduro de propidio	40
❖ Ensayo de inhibición de caspasas	41
❖ Análisis del ciclo celular y subG1	41
❖ Reacción en cadena de la polimerasa de genes de proapoptóticos, antiapoptóticos, angiogénicos y WT1	42
❖ Electroforesis en gel de agarosa	43
❖ Extracción y cuantificación de proteínas	43
❖ Western blot	44
• Electroforesis en gel de poliacrilamida	44
• Trasferencia a membrana de nitrocelulosa	44
• Inmunodetección	44
➤ Ensayos <i>in vivo</i>	45
❖ Material animal	45
❖ Establecimiento de tumor subcutáneo en ratones	45
❖ Esquema de tratamientos con los extractos metanólico y acuoso	46
❖ Obtención del índice tumoral	46
❖ Evaluación de la supervivencia de ratones tratados y no tratados	46
❖ Extracción del tumor	47
➤ Análisis estadístico	47
RESULTADOS	48
➤ Determinación del efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de <i>C. aequipetala</i> en las líneas celulares B16F10, MCF7, HEPG2, INER51 y HEK293	48
➤ Determinación de la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica	52
➤ Ensayo de formación de colonia o clonogénico	53
➤ Ciclo celular y subG1	55

➤ Cinética e Inhibición de caspasas	57
➤ Observación de la condensación nuclear por medio de tinción con Hoechst	66
➤ Fragmentación del ADN	68
➤ Expresión de genes anti y pro apoptóticos, de proliferación y angiogénicos	69
➤ Actividad de los extractos sobre el índice tumoral en un modelo murino	73
➤ Pesos de los tumores tratados y sin tratar	73
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	83
PERSPECTIVAS	85
BIBLIOGRAFÍA	86
BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA	92
RESUMEN BIOGRÁFICO	93
ANEXOS	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Neoplasias predominantes en el mundo, separadas por género.

Tabla 2. Tipos de Medicina Alternativa y Complementaria más empleadas.

Tabla 3. Blancos en los que actúa WT1 y efecto que provoca.

Tabla 4. Ejemplo para calcular la CC_{50} de los extractos empleados

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa de *wtl* y genes angiogénicos, antiapoptóticos y proapoptóticos.

Tabla 6. Condiciones usadas para la reacción en cadena de la polimerasa de *wtl* y genes angiogénicos, antiapoptóticos y proapoptóticos.

Tabla 7. Esquema de tratamiento *in vivo*

Tabla 8. Efecto en la viabilidad celular causada por el extracto acuoso de *C. aequipetala* en las diferentes líneas celulares B16F10, MCF7, INER51, HEPG2 y HEK293.

Tabla 9. Efecto en la viabilidad celular causada por el extracto metanólico de *C. aequipetala* en las líneas celulares B16F10, MCF7, INER51, HEPG2 y HEK293.

Tabla 10. Concentraciones citotóxicas medias del extracto acuoso y metanólico en las diferentes líneas celulares empleadas.

Tabla 11. Efecto en la viabilidad celular del extracto acuoso y metanólico de *C. aequipetala* sobre las células mononucleares de sangre periférica.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diterpenos anticancerosos obtenidos de especies del género *Taxus* (Shu 1998) e imagen representativa de *Taxusbrevifolia*.

Fig. 2. Imagen del arbusto y flores de la vinca de Madagascar o vinca rosada *Catharanthusroseus*.

Fig. 3. Estructuras de los complejos anticáncer naturales y semisintéticos obtenidos de *Catharanthusroseus*.

Fig. 4. Imagen del árbol y flores de la especie *Camptothecaacuminata*

Fig.5. Compuestos semisintéticos derivados de la camptotecina alcaloide obtenido de *C. acuminata*. (Cragg y Newman 2004).

Fig. 6. Planta *Podophyllumpeltatum*.

Fig.7. Fármacos análogos a la podofilotoxina1, etopósido y tenipósido y sus derivados (Abad-Reyes *et al.*, 2008).

Fig. 8. Porcentajes de los usos medicinales de *Cupheaaequipetala* reportados por los habitantes de Villa del Carbón, Estado de México (Aguilar-Rodríguez, *et al.*, 2004).

Fig. 9. Flor, tallo y hoja de la planta *Cupheaaequipetala* “hierba del cáncer”.

Fig. 10. Gráfica del porcentaje de viabilidad celular en las líneas de cáncer B16F10, INER51, HEPG2, HEK293 y MCF7 expuestas al extracto acuoso de *C. aequipetala* concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL.

Fig. 11. Gráfica del porcentaje de viabilidad celular en las líneas de cáncer B16F10, INER51, HEPG2, HEK293 y MCF7 expuestas al extracto metanólico de *C. aequipetalaa* concentraciones de 0.042, 0.085, 0.17, 0.34, 0.51 y 0.68 mg/mL

Fig. 12. Efecto citotóxico producido por el extracto acuoso de *C. aequipetalaa* las 72h de tratamiento, en las líneas celulares B16F10 (1-7), MCF7 (8-14), INER51 (15-21), HEPG2 (22-28) y HEK293 (29-35). Visto con el objetivo 10X del microscopio invertido.

Fig. 13. Efecto citotóxico producido por el extracto metanólico de *C. aequipetalaa* las 72h de tratamiento, en las líneas celulares B16F10 (1-7), MCF7 (8-14), INER51 (15-21), HEPG2 (22-28) y HEK293 (29-35). Visto con el objetivo 10X del microscopio invertido.

Fig. 14. Gráficas del porcentaje de viabilidad en las células mononucleares de sangre periférica, tratadas con el extracto acuoso (grafica de la izquierda) y el extracto metanólico (grafica derecha) a diferentes concentraciones.

Fig. 15. Ensayo de formación de colonias. A y B: Control con 200 y 100 células B16F10 sin tratamiento, C, D, E y F; 500 células tratadas a las concentraciones de 0.085, 0.17, 0.34, 0.68mg/mL respectivamente.

Fig. 16. Gráfica de porcentaje de sobrevivencia de las células B16F10, tratadas con el extracto metanólico de *C. aequipetala*, donde se aprecia que al aumentar la concentración, la sobrevivencia celular decrece.

Fig. 17. Morfología de las colonias observadas en el ensayo clonogénico. A: Control con 100 células B16F10 sin tratamiento, B, C, D y E; 500 células tratadas a las concentraciones de 0.085, 0.17, 0.34, 0.68mg/mL respectivamente. A y B vistas con aumento de 10X, C con 20X, D y E 40X.

Fig. 18. Histogramas del ciclo celular. 1a y b. Ciclo celular pasadas las 24h con los respectivos tratamientos. Negro (C-), Rojo (Trat metanolico), Azul (C+). 2 a y b. células despues de 48h y 3 a y b. células despues de 72h con los tratamientos.

Fig. 19. Porcentaje de la distribución de las fases del ciclo celular, en las células de melanoma murino, sin tratamiento (Cneg), tratadas con extracto metanólico de la hierba del cáncer (CC50) y tratadas con etoposido 150 μ M (Cpos) a diferentes horas (24, 48 y 72h).

Fig. 20. Cinética de muerte de la línea celular B16F10 tratada a diferentes concentraciones y periodos de tiempo.

Fig. 21. Cinética de muerte del control negativo, células B16F10 sin tratamiento, que fueron teñidas con Annexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están vivas, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Annexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

Fig. 22. Cinética de muerte en células B16F10 tratadas con 0.135mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Annexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están vivas, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Annexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

Fig. 23. Cinética de muerte. Células B16F10 tratadas con 0.270mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Annexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Annexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h

Fig. 24. Cinética de muerte. Células B16F10 tratadas con 150 μ M del etoposido, usado como control positivo, teñidas con Annexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Annexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

Fig. 25. Cinética de muerte. Celulas B16F10 tratadas con 2mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Annexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están muertas debido a la falta de tamaño y exceso de granularidad, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Annexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

Fig. 26. Porcentaje de células annexina positivas en los diferentes tratamientos, con y sin inhibidor de caspasa (Q-VD-Oph).

Fig. 27. Plots de células B16F10 (Cneg) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FLA-A), cuadrante inferior izquierdo es doble negativo, derecho inferior Ann+, superior derecho doble positivo y cuadrante superior izquierdo PI+.

Fig. 28. Plots de células B16F10 (CC50) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas, a la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FLA-A), cuadrante inferior izquierdo es doble negativo, derecho inferior Ann+, superior derecho doble positivo y cuadrante superior izquierdo PI+.

Fig. 29. Plots de células B16F10 (Cpost.) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas, a la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el

dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FLA-A), cuadrante inferior izquierdo es doble negativo, derecho inferior Ann+, superior derecho doble positivo y cuadrante superior izquierdo PI+.

Fig. 30. Tinción nuclear con Hoechst 33258. Micrografía fluorescente de las células B16F10 después de 48h tratadas con a 1, 2. Control positivo, tratamiento con etopósido (150 μ M), b1, 2. 0.270mg/mL del extracto metanólicas y c1, 2 Control negativo sin tratamiento. Las figuras a,b y c 1 son imágenes compuestas la luz visible traslapada con la luz fluorescente, las imágenes a,b y c 2. Son solo las fluorescentes.

Fig. 31. Gráfica del porcentaje de picnosis en células B16F10 sin tratamiento y tratadas con el extracto metanólico de *C. aequipetala* a una concentración de 270 μ g/mL (CC₅₀), $p = 0.001$

Fig. 32. Fragmentación de ADN. La imagen muestra el gel de agarosa al 2% en el cual se cargaron 5 μ L de las extracciones de ADN de las células B16F10 tratadas con 1. Doxorubicina, 2. Extracto metanólico, 3. Sin tratamiento. Se aprecia como un escalonamiento, en los primeros dos carriles, mientras que en el tercero no. La estela en forma de escalera que se observa, nos indica que la forma de muerte es por apoptosis.

Fig. 33. Gel de agarosa al 1%, con los productos del PCR de los diferentes genes pro y antiapoptóticos, en las líneas celulares B16F10, MCF7 y HEPG2. 1. Marcador de talla molecular. 2. ST, 3. Cél. Expuestas al extracto metanólico a 6h, 4. 12h, 5. 24h, 6. 48 y 7. C- (sin ADN).

Fig. 34. Expresión d las proteínas de los genes Bcl-2 y Bax, en B16F10. El carril 1, célula sin tratamiento, 2, 3, 4,5 y 6, diferentes tiempo de exposición al extracto, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h respectivamente. β -actina empleado como gen constitutivo de control de carga.

Fig. 35. Gel de agarosa al 1%, con los productos del PCR de los diferentes genes angiogénicos y *wt1* en las líneas celulares B16F10, MCF7 y HEPG2. 1. Marcador de talla molecular. 2. ST, 3. Cél. Expuestas al extracto metanólico a 6h, 4. 12h, 5. 24h, 6. 48 y 7. C- (sin ADN).

Fig. 36. Expresión d las proteínas del gen WT1, en MCF7. El carril 1, célula sin tratamiento, 2, 3, 4,5 y 6, diferentes tiempo de exposición al extracto, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h respectivamente. β -actina empleado como gen constitutivo de control de carga.

Fig. 37. Gráfica de los cambios de peso en los ratones durante ensayo *in vivo*, tanto para el extracto acuoso como para el metanólico. Línea azul control sin tratamiento y roja tratadas.

Fig. 38. Gráfica del promedio de los pesos en gramos de los tumores, tratados con el extracto acuoso y sin tratar, se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos. $p=0.0283$.

Fig. 39. Gráfica del promedio de los pesos en gramos de los tumores, tratados con el extracto metanólico y sin tratar, se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µg/mL	Microgramos por mililitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ann	Anexina
ATCC	American Type Culture Collection
B16F10	Melanoma murino
CAM	Medicina Alternativa y Complementaria o Complementary and Alternative Medicine
CC ₅₀	Concentración citotóxica al 50 porciento
CE ₅₀	Concentración efectiva al 50 porciento
cm	Centímetros
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica,
CPT 11	Irinotecan
CPT's	Análogos de camptotecina
Conc.	Concentración
DE ₅₀	Dosis efectiva al 50 porciento
DesvestStd	Desviación estándar
DMEM	Dulbecco's Eagle's
DMSO	DimetilSulfóxido
E.U.A.	Estados Unidos de América
Fase M	Fase de Mitosis o Meiosis
Fase S	Fase de Síntesis
Fig.	Figura
g	Gravedades
g/L	Gramos por litro
HEK293	Línea transformada de riñón humano
HepG2	Hepatocarcinoma humano

IC	Índice de combinación
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía
INER51	Adenocarcinoma de pulmón humano
LHRH	Hormona liberadora de gonadotropina, Luteinizing hormone releasing hormone.
MCF7	Adenocarcinoma mamario humano
MCP	Muerte celular programada
Mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mmol/L	Milimolar por litro
MTT	(Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazólico)
NCI	Instituto Nacional de Cáncer
nm.	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS 1X,	Buffer de Fosfato
pH	Potencial de Hidrógeno
PI	Yoduro de propidio
Q-VD-OPh	Quinolil-valil-O-metilaspartil-[-2,6-difluorofenoxy]-metil cetona
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SERMs	Moduladores Selectivos de los Receptores Estrogénicos (Selective Estrogen Receptor Modulators)
TE	Buffer Tris-EDTA
UV	Ultra Violeta
var.	Variedad
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Cuphea aequipetala, denominada popularmente como hierba del cáncer, es una planta de uso común en el centro de México para tratar el cáncer. Esta hierba muestra efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Sin embargo se desconoce su efecto sobre células no neoplásicas, el tipo de muerte que provoca y su mecanismo molecular, este trabajo pretendió conocer el efecto tóxico de los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala* sobre las líneas celulares transformadas B16F10, MCF7, INER51, HEPG2 y HEK293 y el cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) *in vitro*, así como en un modelo de melanoma murino. Además de explorar el efecto en la expresión de genes apoptóticos, de proliferación y angiogénicos en las líneas celulares. La citotoxicidad y proliferación celular se evaluaron mediante el ensayo de MTT y el ensayo clonogénico; los detalles del mecanismo de muerte se examinaron por citometría de flujo por medio de tinción simple con PI, para el ciclo celular; y con la tinción doble de Ann-PI para observar apoptosis e inhibición de caspasas con Q-VD-OPh; la condensación nuclear se observó mediante tinción con Hoechst 33258; la modulación de genes como *bcl-2*, *bcl-X_L* y *s*, *wl1*, *vegf* y *egr-1* se realizó por PCR; y la expresión de proteínas de WT1, Bcl-2 y Bax, se llevó a cabo por Western blot. Los resultados *in vitro* muestran que el extracto metanólico presenta mayor citotoxicidad en contra de las células neoplásicas estudiadas que el acuoso y ningún extracto afectó la viabilidad de las CMSP. En cuanto al mecanismo de muerte, se observaron cambios morfológicos típicos de las células apoptóticas: condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, así como la detención del ciclo celular en la fase G1 con el aumento de las proporciones de células sub-G1, pero por otro lado se obtuvo que la muerte celular es independiente de caspasas, por lo que se necesitan más estudios para elucidar el mecanismo exacto de muerte, ya que la modulación de genes pro y anti apoptóticos no fueron claros. *In vivo* ambos extractos redujeron la masa tumoral, teniendo mayor eficiencia el acuoso. Nuestros resultados indican que los extractos de *C. aequipetala* son selectivos a células neoplásicas, disminuyen el tamaño de los tumores y mejoran la calidad de vida en ratones. Basados en estos datos, *C. aequipetala* representa un candidato potencial como agente quimiopreventivo y/o quimioterapéutico.

ABSTRACT

Cuphea aequipetala, popularly known as “hierba del cancer” is a plant commonly used in central Mexico to treat cancer. This herb shows cytotoxic effect on different cancer cell lines. However its effect on non-neoplastic cells, the mechanism of death and its molecular mechanism are unknown, this paper aims to determine the toxic effect of the aqueous and methanolic extracts of *C. aequipetala* on B16F10, MCF7, INER51, HEPG2, HEK293 transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro*, also in a murine melanoma model *in vivo*. Also to explore the possible effect on the expression of apoptotic, proliferation and angiogenic genes on cell lines. The cytotoxicity and cellular proliferation were assessed by the MTT and clonogenic assay; the details of the mechanism of death were examined by flow cytometry using PI simple staining, for the cell cycle and with Ann-PI double staining for observing apoptosis and caspase inhibition with Q-VD-OPh; the nuclear condensation was observed with Hoechst 33258 staining; genes modulation such as *bcl-2*, *bcl-X_L* and *p53*, *wt1*, *vegf* and *egr-1* was performed by PCR; and WT1, Bcl-2 and Bax protein expression was carried out by Western blot. The *in vitro* results show that the methanol extract exhibits a major cytotoxicity against the tumor cells studied than the aqueous one and viability of PBMC is not affected. Regarding the mechanism of death typical morphological changes of apoptotic cells was observed: chromatin condensation, nuclear fragmentation, and the cell cycle arrest in the G1 phase with increasing proportions of sub-G1 cells. Furthermore we found cell death caspases independent, more studies are needed to elucidate the mechanism of death exact, pro and anti-apoptotic genes modulation still unclear. Aqueous and methanolic extracts reduced the tumor mass *in vivo*, having more efficiency the aqueous one. Our findings indicate extracts of *C. aequipetala* are selective to cancer cells, reduces tumor size and improved quality of life in mice. Based on these data, *C. aequipetala* represents a potential candidate as a chemopreventive and / or chemotherapeutic agent.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de que el cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento y proliferación incontrolada de células malignas, con origen multifactorial (factores físicos, químicos, genéticos y estilo de vida), que afecta a toda la población sin importar sexo, edad o clase social, representando un serio problema de salud a nivel mundial, nos hace buscar nuevas terapias para su tratamiento.

Los métodos empleados en la medicina convencional para este padecimiento son la escisión quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, terapias hormonales e inmunoterapia, a pesar de estos procesos las neoplasias siguen siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8.2 millones de defunciones (WHO, 2014). La mayoría de los tratamientos mencionados son agresivos en contra del paciente, por lo cual se buscan tratamientos menos tóxicos de diversos orígenes para tratar dicha enfermedad. A las terapias que están fuera de la medicina alopática se le conoce como Medicina Alternativa y Complementaria (MAC), la integración de MAC's en cuanto al manejo de cáncer, muestran a menudo un beneficio para el paciente; el uso de extractos de plantas está dentro de esta categoría de medicina.

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para tratar diferentes dolencias y a pesar de que algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas han demostrado ser erróneas, la herbolaria medicinal se basa en los hallazgos empíricos de miles de años y ha logrado proporcionar medicamentos valiosos, tales como analgésicos (morfina), antitusígenos (codeína), antihipertensivos (reserpina), cardiotónicos (digoxina), antipalúdicos (quinina y la artemisinina) y antineoplásicos (vinblastina y taxol) (Ramawat *et al.*, 2009).

Más del 50% de los medicamentos utilizados en ensayos clínicos para la actividad contra el cáncer, se aislaron a partir de fuentes naturales o están relacionados con ellos (Newman y Cragg, 2007). Por lo tanto, la búsqueda de productos naturales a ser

utilizados en la terapia del cáncer representa un área de gran interés. Se dice que hay dos estrategias principales para la selección de especies de plantas en el descubrimiento de medicamentos: la selección aleatoria y los conocimientos médicos tradicionales. Este último enfoque incluye plantas usadas en sistemas organizados de medicina tradicional como la herbolaria, el folclor y el chamanismo, que han demostrado, de manera empírica, tener un efecto curativo (Pieters y Vlietinck, 2005).

Se necesita más investigación en el campo de la herbolaria, tanto para demostrar si las plantas empleadas por cientos de personas poseen propiedades curativas verídicas, como para encontrar nuevos compuestos que puedan ser purificados y empleados en enfermedades que no poseen un tratamiento definitivo, como lo es el cáncer. Este último punto debido a que se sabe que algunas hierbas tienen actividad citotóxica en contra de células cancerosas, mostrando efectos apoptóticos y antiproliferativos.

Por lo anterior este trabajo pretendió probar el efecto citotóxico tanto *in vitro* como *in vivo* de los extractos metanólico y acuoso de la planta *Cuphea aequipetala*, conocida en México como Hierba del Cáncer por su uso entre personas con alguna neoplasia y la cual posee limitada descripción de su capacidad antineoplásica y antiproliferativa.

Es de gran importancia dilucidar si los extractos de esta planta son una opción para ayudar a tratar diferentes tipos de neoplasias y con ello poder usar dichos extractos como terapia alternativa o de ayuda junto con tratamientos quimioterapéuticos.

ANTECEDENTES

Generalidades del Cáncer

El cáncer es una enfermedad que tiene la capacidad de afectar a cualquier tipo celular, su característica principal es la falta de control de la proliferación celular, diferenciación y muerte, invadiendo a tejidos y órganos (Laundry de Mesquita *et al.*, 2009). Este padecimiento puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo y puede originarse por diversos factores como la exposición a sustancias carcinogénicas, radiación, agentes infecciosos, desordenes genéticos, edad, estilo de vida, entre otros, causando un gran número de muertes al año (WHO, 2014).

Características del Cáncer

Las características de esta enfermedad comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de los tumores humanos.

1. Mantenimiento de la señalización proliferativa.
2. Evasión de supresores del crecimiento.
3. Resistencia a la muerte celular.
4. Inmortalidad replicativa.
5. Inducción de la angiogénesis.
6. Activación de la invasión y la metástasis.

Actualmente se añaden dos características: La reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune.

Además los tumores muestran otra dimensión de complejidad: contienen un repertorio de células reclutadas generando un 'microambiente tumoral' que afecta cada vez más el desarrollo de nuevos medios para tratar el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Hay muchas dificultades en el tratamiento del cáncer, siendo las más frecuentes:

- Resistencia a los fármacos.
- La toxicidad.
- Baja especificidad.

(Laundry de Mesquita *et al.*, 2009).

Epidemiología de cáncer a nivel Mundial

La Organización Mundial de la Salud estima que en el 2030 habrá 13.1 millones de muertes por cáncer en todo el mundo; se le atribuyen 8.2 millones de muertes en el 2012 y más de 32.6 millones de personas viven con este padecimiento, siendo esta enfermedad la principal causa de muerte en el mundo. (WHO, 2014). Las clases más habituales de cáncer en todo el mundo (en orden del número de las defunciones mundiales) y la frecuencia para hombres y mujeres se muestran en la tabla 1.

Las neoplasias que causan la mayoría de las defunciones cada año son: cáncer de pulmón (1.59 millones de muertes), hígado (745 000 defunciones), cáncer de estómago (723 000 defunciones), colorectal (694 000 defunciones), cáncer de mama (521 000 defunciones) y esofágico (400 000) (WHO, 2014).

Tabla. 1. Neoplasias predominantes en el mundo, separadas por género

Principales tipos de cáncer en el mundo (WHO, 2012).	
Hombres	Mujeres
Pulmón (23.6%)	Mama (14.7%)
Hígado (11.2%)	Pulmón (13.8%)
Estómago (10.1%)	Colorrectal (9.0%)
Colorrectal (8.0%)	Cérvico-Uterino (7.5%)
Próstata (6.6%)	Estómago (7.2%)
Esófago (6.0%)	Hígado (6.3%)

Cáncer en América

El cáncer representa la segunda causa de muerte en la región de las Américas, donde se registraron unos 2,8 millones de casos nuevos y 1,3 millones de muertes por cáncer en 2012 y se espera que aumente a 2.1 millones de defunciones para el 2030. Los tipos más frecuentes de cáncer en la región incluyen: los cánceres de pulmón, próstata y colorrectal entre los hombres; y los cánceres de mama, pulmón y colorrectal entre las mujeres. Además se espera que la carga del cáncer aumente de forma significativa como consecuencia del envejecimiento de la población y de la transición epidemiológica que está registrando América Latina y el Caribe (OPS/WHO, 2014).

Cáncer en México

En México las neoplasias son la tercera causa de mortalidad con 71, 350 defunciones en el año 2011 y en Nuevo León los tumores malignos son la segunda causa de muerte (2, 954 defunciones en el 2007) de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013).

Medicina Alopática contra el cáncer

En general se aplican tres principales tipos de tratamientos contra el cáncer: escisión quirúrgica o cirugía, quimioterapia y radioterapia, sin embargo, otros métodos aceptados para el tratamiento de esta enfermedad son la terapia hormonal y la inmunoterapia.

Escisión Quirúrgica

Fue la primera terapia anticancerosa empleada y hasta nuestros días sigue siendo la más utilizada debido a que es rápida y efectiva, cuenta con el mayor número de curaciones y ofrece la oportunidad de demostrar que el cáncer ha sido erradicado del organismo ya que el patólogo puede examinar el espécimen retirado, el cual debe presentar una capa de células normales alrededor de la forma cancerosa. Sin embargo, presenta desventajas

ya que la eliminación de la masa tumoral visible no garantiza la eliminación de extensiones microscópicas, que caracterizan al cáncer (metástasis). Además si el tumor afecta órganos vitales puede dañar las funciones fisiológicas y apariencia del paciente al intentar removerse. (Hellman y Vokes, 1996).

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos antineoplásicos que provocan la destrucción de las células tumorales, al obstaculizar sus funciones, incluida la división celular. Se emplea ante todo para el tratamiento de neoplasias generalizadas, aunque a veces se utiliza para lesiones localizadas como coadyuvante de otros tratamientos.

El tratamiento, su duración, dosis, tipo de fármaco, entre otros, dependen de factores tan diversos como el tipo de cáncer, su localización y estado general del paciente (NANDA, 2003).

En la actualidad se usan más de 100 medicamentos diferentes para combatir la enfermedad y prevenir el crecimiento de las células malignas, se emplean los fármacos solos o en combinación con otros medicamentos o tratamientos. Dichos fármacos están dirigidos a bloquear la multiplicación caótica que implica la enfermedad. Algunos quimioterapéuticos sólo ejercen su acción en células que se están reproduciendo activamente, otros atacan específicamente a las células en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo en la fase M o S. Sin embargo no están específicamente dirigidos hacia células malignas y es por ello que células normales con una tasa alta de proliferación como las células del sistema inmune y los folículos pilosos, células de recubrimiento del tracto digestivo y del tracto reproductor, se ven afectados por estos quimioterapéuticos, causando efectos secundarios en los pacientes tratados (American Cancer Society, 2010).

Algunos efectos secundarios son:

- Fatiga
- Náuseas
- Vómitos
- Caída del pelo
- Lesiones en la boca
- Dolor
- Conteo de células sanguíneas bajo

Los órganos que sufren daño principalmente son:

- El corazón
- Los pulmones
- Los nervios
- Los riñones
- Los órganos reproductores

Radioterapia

Consiste en el uso de energía ionizante y su finalidad es eliminar las células cancerosas y reducir la masa tumoral. La radiación puede dañar a cualquier molécula dentro de la célula, el daño más notable es al ADN causando muerte celular que se expresa como pérdida de proliferación, las células pueden morir en interfase o muerte relacionada con la mitosis. Pero este tipo de terapia puede afectar a las células normales, además de que se ha observado que el efecto depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células malignas. Adicionalmente, existen células más resistentes que otras, por lo cual no se asegura la muerte de todas las células malignas irradiadas (Tannock y Hill, 1998).

Terapia Hormonal

Las hormonas son sustancias que funcionan como mensajeros químicos en el cuerpo. Pueden ser proteínas pequeñas o derivados de los esteroides. Afectan las acciones de las células y de los tejidos en varios lugares del cuerpo y ordinariamente llegan a sus objetivos por medio del torrente sanguíneo (Instituto Nacional del Cáncer, 2012).

La terapia hormonal (llamada también hormonoterapia, tratamiento hormonal o terapia endocrina) hace más lento o detiene el crecimiento de tumores sensibles a las hormonas ya que bloquea la capacidad del cuerpo para producir hormonas o interfiere en la actividad hormonal. Las neoplasias sujetas a tratamientos hormonales son: cánceres de la mama, de ovario y de próstata. Sin embargo, los tumores que no son sensibles a las hormonas no reaccionan a la terapia hormonal (Instituto Nacional del Cáncer, 2012).

Los fármacos de la terapia hormonal se clasifican:

- Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno (SERMs por sus siglas en inglés): Estos fármacos funcionan al interferir con la actividad del receptor de estrógeno.
- Inhibidores de la aromataasa: Estos agentes funcionan al bloquear la producción del estrógeno por la enzima que la hace de sus precursores.
- Reguladores de receptores: Esta clase de fármacos funcionan al bajar los niveles del receptor del estrógeno.
- Moduladores Selectivos de los Receptores de Andrógenos (SARMs por sus siglas en inglés): Estos agentes funcionan al interferir con la actividad del receptor de andrógeno (Instituto de Cáncer Winship, 2008).

Su principal inconveniente es su uso limitado a pocos tipos de neoplasias además el uso de los fármacos pueden aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares por el aumento de colesterol en la sangre en el caso del uso de análogos y antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y antiandrógenos en el tratamiento de cáncer de próstata (American Cancer Society, 2013).

En el caso de los tratamientos para cáncer de seno en mujeres y hombres los efectos adversos además de los bochornos y cambios de humor son la formación de coágulos sanguíneos y el tamoxifeno puede ayudar al desarrollo de cáncer en el endometrio y uterino en mujeres (Fisher *et al.*, 1998).

Inmunoterapia

El Sistema inmunológico es una organización de defensa de múltiples funciones que evolucionó para proteger a los animales de la invasión de los microorganismos patógenos y el cáncer (Kindt *et al.*, 2007). En el cáncer el rol del sistema inmunológico consiste en erradicar las células cancerígenas por medio de respuestas específicas del tipo adaptativo mediadas principalmente por células T (Abbas, 2008).

Existen dos formas en que el sistema inmunológico puede responder contra las células neoplásicas:

1. Respondiendo contra antígenos específicos del tumor (Moléculas que se encuentran presentes únicamente en las células malignas y no aparecen en células normales del cuerpo).
2. Antígenos asociados al tumor (Moléculas que no son únicas de células tumorales pero que están presente de forma diferente en células normales) (Kindt *et al.*, 2007).

En la inmunoterapia del cáncer el tratamiento puede consistir en un refuerzo del sistema inmunitario a través del uso de un coadyuvante o una citocina, entre las citocinas valoradas en inmunoterapia se encuentran: INF- α , INF- β e INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-12, GMS-CSF y TNF, o algo más específico como el uso de anticuerpos monoclonales dirigido contra tipos específicos de tumores (Kindt *et al.*, 2007) así como los tratamientos que está en investigación como la inmunoterapia de células T adoptivas (Gattinoni *et al.*, 2006).

Otros Tratamientos

Actualmente, a pesar del desarrollo de técnicas modernas de cirugías y trasplantes, mejores métodos de irradiación, al igual que nuevos fármacos citotóxico, que dan la posibilidad de tratar exitosamente algunas formas de cáncer, existen células neoplásicas que logran sobrevivir y diseminarse en el organismo. Es por ello que siguen las

investigaciones para proponer otros tratamientos experimentales como el uso de vacunas de ADN, vacunas de proteínas, uso de microRNAs, RNA de interferencia, entre otros para combatir las neoplasias, buscando evitar los efectos secundarios devastadores para los pacientes.

Sin olvidar que hay remedios usados tradicionalmente por personas que sufren algún tipo de neoplasia, como la herbolaria, uso de suplementos alimenticios, cambios de dietas y estilo de vida, a este tipo de tratamientos se les conoce como medicina alternativa y complementaria

Medicina Alternativa y Complementaria

La medicina alternativa y complementaria (MAC o CAM por sus siglas en inglés; Complementary and Alternative Medicine) es comúnmente practicada en nuestro país, en especial por adultos con enfermedades crónicas-degenerativas (Aceves -Ávila *et al.*, 2001; Argaez-López *et al.*, 2003).

Se define a MAC como un dominio amplio de los recursos curativos que abarca todos los sistemas de salud, modalidades prácticas, teorías y creencias, que no sean los intrínsecos al sistema de salud políticamente dominante de una sociedad o cultura dentro de un determinado período histórico (NIH 1997). De igual forma lo definen como aquellos tratamientos que generalmente quedan fuera de la corriente principal de la medicina alopática (Kelly *et al.*, 2004). Otros lo definen como cualquier agente o práctica iniciada a partir del diagnóstico que no forman parte de la norma de atención para un paciente con cáncer (Gómez-Martínez *et al.*, 2006).

El uso de terapias alternativas no necesariamente es inocuo y puede ser dañino a través de una variedad de mecanismos, tales como: la reducción de la eficacia de la quimioterapia debido a las interacciones de los suplementos a base de hierbas o antioxidantes, la contaminación por *Salmonella* o sustancias tóxicas como el mercurio y el arsénico o la interrupción del tratamiento formal, ya que algunas terapias se han promocionado como curas para el cáncer; en especial el uso de extractos de hierbas

puede afectar el funcionamiento correcto de diversos órganos como el hígado o riñones (Gómez-Martínez *et al.*, 2006).

En una encuesta realizada en México, a padres de niños con cáncer (110 pacientes), que han usado la Medicina Alternativa y Complementaria; la información recabada arrojó que el uso de la terapia con hierbas o extractos de plantas es del 69% (53 pacientes), seguido por otros productos como piel de víbora, calcio de coral, cartílago de tiburón entre otros. Esta preferencia por el uso de remedios herbolarios refleja un patrón cultural antiguo observado en adultos mexicanos con enfermedades reumáticas, en los cuales estas terapias han sido documentadas hasta en el 50% de los pacientes, lo anterior se resume en la Tabla 2 (Aceves-Ávila *et al.*, 2001).

Tabla 2. Tipos de Medicina Alternativa y Complementaria más empleadas.

Tratamiento Alternativo Utilizado	# de Pacientes	Porcentaje (%)
Hierbas o extractos de plantas administrados oralmente	53	69
Otros productos administrados por vía oral	20	26
Homeopatía	19	25
Suplementos nutricionales	9	12
Cambios en la dieta	7	9
Bioenergéticos	7	9
Oraciones	3	4
Pomadas directamente en la piel	1	1

Tabla tomada de Aceves-Ávila *et al.*, 2001, N=77 encuestados, algunos usan más de dos MAC's.

Plantas Medicinales. Tradición herbolaria

Las plantas han constituido la base de sofisticados sistemas de medicina tradicionales que han existido desde hace miles de años y seguirán proporcionando a la humanidad nuevos remedios (Gurib-Fakim, 2006). Es en el hemisferio sur del planeta donde el 80%

de la población todavía depende de un sistema tradicional de la medicina basada en hierbas medicinales (Ramawat y Goyal, 2008).

A medida que las civilizaciones se desarrollaron para los 3000 años a. C. en Egipto, Medio Oriente, India y China, el uso de las hierbas medicinales se volvió más sofisticado y se prepararon registros escritos sobre ellas. Los primeros registros, están en tablillas de arcilla en escritura cuneiforme y son de Mesopotamia, datan de alrededor de 2600 a. C. (Gurib-Fakim, 2006), pero las plantas específicas a ser utilizadas y los métodos de aplicación para las dolencias particulares se transmitían a través de la historia oral. Posteriormente, la información sobre las plantas medicinales a base de hierbas se registró en herbarios (Balunas y Kinghorn 2005). Históricamente, los medicamentos a base de hierbas se utilizaron como tinturas, emplastos, polvos y tés seguido de formulaciones, y por último, como compuestos puros (Ramawat *et al.*, 2009).

Plantas como fuente de compuestos anticáncer

Moléculas vegetales, sus derivados semisintéticos y sintéticos son fuentes importantes de fármacos antitumorales. Según Cragg y Newman en el 2007, más del 50% de los fármacos en los ensayos clínicos para actividad contra el cáncer, se aislaron a partir de fuentes naturales o están relacionados con ellos.

Alrededor de dos docenas de nuevos fármacos derivados de fuentes naturales fueron aprobados por la FDA y se introdujo en el mercado durante el período 2000-2005 y se incluyen medicamentos para el cáncer, enfermedades neurológicas, cardiovasculares, metabólicas e inmunológicas, y desórdenes genéticos (Ching *et al.*, 2006). Siete derivados de plantas fármacos actualmente utilizados clínicamente para varios tipos de cánceres son taxol a partir de especies de *Taxus*, la vinblastina y la vincristina de *Catharanthus roseus*, topotecan e irinotecan a partir de *Camptotheca accuminata*, etopósido y tenipósido de *Podophyllum peltatum* (Patwardhan *et al.*, 2004).

Paclitaxel (Taxol), es un diterpeno aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*. A pesar de que el interés por este árbol se dio en 1960, ya se conocían las propiedades medicinales del árbol del tejo desde siglos atrás; a este árbol se le conocía como árbol de la muerte por sus características venenosas; las tribus norteamericanas las usaban como desinfectante, para provocar el aborto, así como para el tratamiento del cáncer de piel (Nicolaou *et al.*, 1996). En 1964 el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) encontró que un extracto de la corteza *Taxus brevifolia*, era tóxico para los cultivos de células de leucemia. Sin embargo el aislamiento del compuesto responsable de la citotoxicidad fue realizado en 1967 por Mansuck C. Wani y Monroe E. Wall y lo nombraron Taxol, ya que comparte similitudes químicas con la familia de taxanos, además que se obtuvo de una planta del género *Taxus* (Orbelies y Kroll, 2004). El mecanismo de acción del paclitaxel y docetaxel, ambos compuestos conocidos como taxanos, es unirse a los microtubulos (Horwitz, 2004), afectando de manera dinámica la división celular induciendo de esta manera la muerte de las células (Rowinsky y Donehower, 1995; Tannock y Hill, 1998).

El paclitaxel se puso en el mercado en 1993, para el tratamiento de cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi y cáncer de mama. El docetaxel se aprobó en Estados Unidos en 1996 para su uso en cáncer de mama (Shu, 1998). Estos fármacos atacan preferentemente a que las células cancerosas ya que se dividen con mayor frecuencia que las normales, sin embargo existen células normales con una alta tasa de proliferación como los linfocitos y los folículos pilosos, que con frecuencia son afectados, teniendo como consecuencia la depresión del sistema inmune, retraso de las sanciones nerviosas, náuseas y pérdida de cabello (Tannock y Hill, 1998).

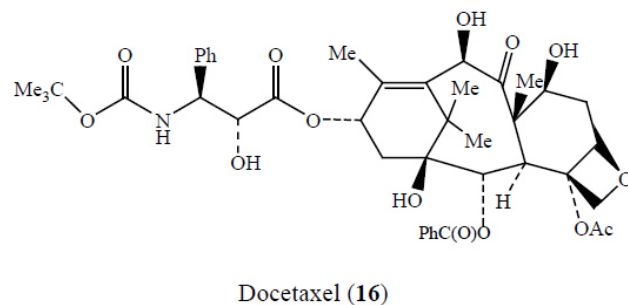
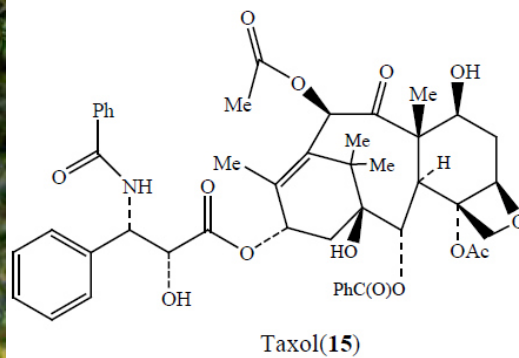


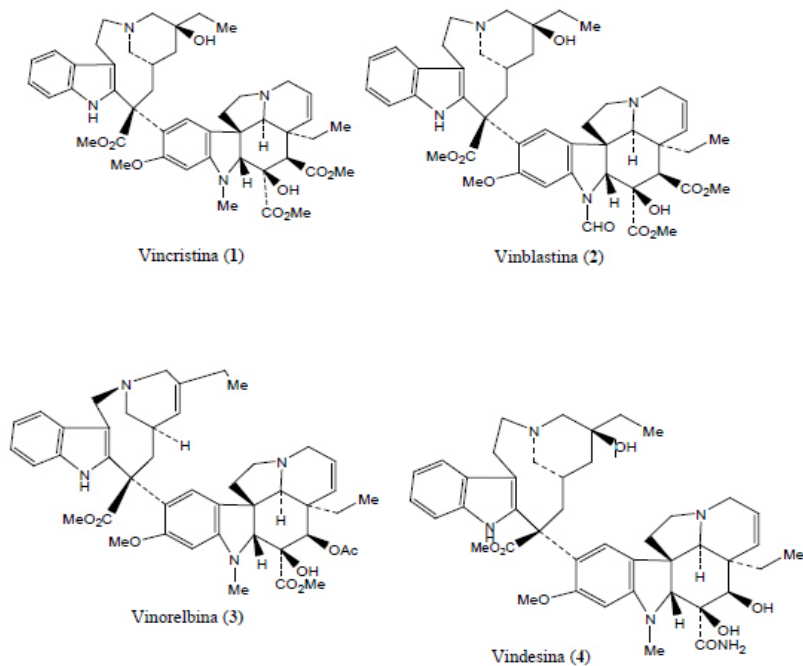
Fig. 1. Izquierda: imagen representativa de *Taxus brevifolia*. Derecha: Diterpenos anticancerosos obtenidos de especies del género *Taxus* (Shu 1998)

Vinblastina y Vincristina: se aislaron de una planta usada para el tratamiento de la diabetes: *Catharanthus roseus* (Vinca de rosada) (Cragg *et al.*, 1994). Posteriormente con modificaciones químicas se logró obtener compuestos semisintéticos como la vinorelbina y vindesina (Newman *et al.*, 2000). La vincristina junto con otros medicamentos se emplea para tratar leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer de cervicouterino, de colon, de mama, entre otros carcinomas (Moura *et al.*, 2002), la vinblastina se ha empleado para el linfoma de Hodgkin, carioepitelioma y cáncer de ovario al igual que la vinorelbina (Silva *et al.*, 2003). Estos compuestos son alcaloides que se unen a la tubulina, evitando la polimerización de los dímeros de tubulina y por ende la formación de los microtúbulos, los cuales son de vital importancia para la formación del huso en la célula que entrara en mitosis, además de proporcionar forma y estabilidad a la célula, motilidad, adherencia y transporte a la célula. Cuando el complejo tubulina-alcaloide se une a los microtúbulos trae como consecuencia que la célula sea arrestada en la fase M del ciclo celular. (Warber, 1999).



Fig. 2. Imagen del arbusto y flores de la vinca de Madagascar o vinca rosada *Catharanthus roseus*.

Fig. 3. Estructuras de los complejos anticáncer naturales y semisintéticos obtenidos de *Catharanthus roseus*.



La camptotecina fue aislada de la *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino, sus extractos fueron investigados en la década de los 50 como fuente de saponinas esféricas para su posterior conversión en cortisona y fue al azar que se decidió evaluar su actividad antitumoral (Cragg *et al.*, 1994), observándose que el principio activo era la camptotecina (Oberlies y Kroll 2004). Sin embargo, debido a la alta toxicidad de la sal sódica de la camptotecina, la evaluación clínica de este extracto fue suspendida (Newman *et al.*, 2000). Y fue hasta 1985 que el interés por esta molécula se retomó debido a su novedoso mecanismo de acción que involucra a la topoisomerasa I, una enzima encargada del relajamiento del ADN durante la replicación (Newman 2004). Esta molécula fue modificada químicamente y se obtuvieron distintos compuestos químicos como el topotecan, aprobado posteriormente para el tratamiento contra el

cáncer de ovario en 1996 en Estados Unidos (Shu 1998), el irinotecan (CPT 11), usado en Japón desde 1994 y posteriormente aprobado en EUA en 1996, para tratar el cáncer colorrectal, ovario y pulmón (Shu, 1998; Oberlies y Kroll 2004), y los compuestos 9-aminocamptotecina, 9-nitro-camptotecina y DX-8915F los cuales tienen mayor efecto citotóxico que la irinotecan y la topotecan. (Shu, 1998). Estos estudios corroboraron que el bloqueo de la actividad de la Topoisomerasa I puede ser usado como blanco terapéutico, ya que esta enzima se ha encontrado sobreexpresada en los tumores malignos (Husain *et al.*, 1994). La camptotecina y sus análogos (CPT's) actúan al enlazarse con el ADN-Topo I, lo que estabiliza dicho complejo divisible, evitando así la liberación del ADN y por lo tanto la replicación (Fan *et al.*, 1998).



Fig. 4. Imagen del árbol y flores de la especie *Camptotheca acuminata*

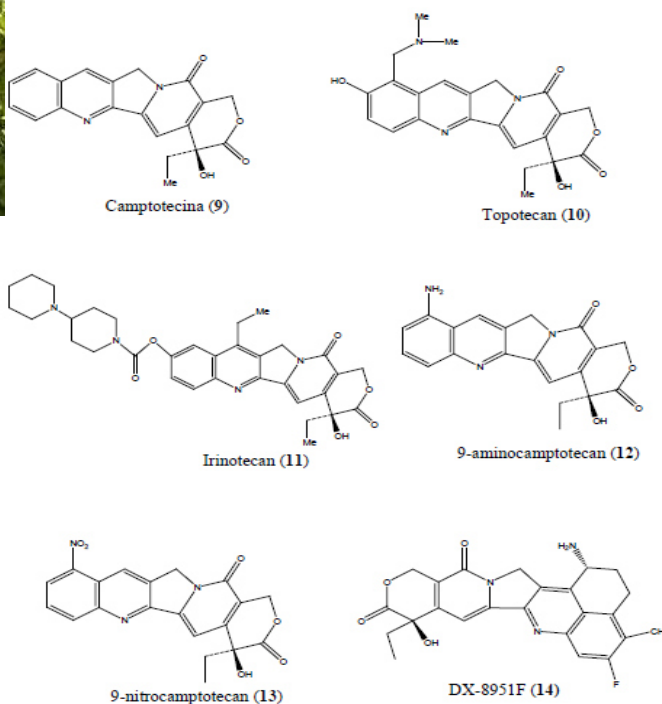


Fig.5. Compuestos semisintéticos derivados de la camptotecina alcaloide obtenido de *C. acuminata*. (Cragg y Newman 2004).

Etopósido y Tenipósido son derivados semisintéticos provenientes de un lignano conocido como podofilotoxina 1, extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. Estos fármacos resultan útiles en el tratamiento de neoplasias como linfomas, leucemias

agudas, Sarcoma de Kaposi asociado a al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, y cánceres de pulmón, ovario, testículo, vejiga y cerebro (Xiao *et al.*, 2004). La podofilotoxina 1 es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina y mientras que el etopósido y el tenipósido actúan como inhibidores de la topoisomerasa II, una enzima nuclear que resuelve diversos problemas topológicos del ADN, los cuales surgen en procesos biológicos involucrados en la división celular, tales como transcripción, recombinación-replicación y reparación cromosómica (Alton y Harris, 1993). Tanto el etopósido como el tenipósido han sido sometidos a modificaciones estructurales, esto para mejorar su eficiencia clínica así como para superar algunos problemas asociados a su uso como el desarrollo de resistencias, mielosupresión y baja biodisponibilidad por vía oral, algunos productos generados son TOP53, GL331 y el etopofos (Abad-Reyes *et al.*, 2008).



Fig. 6. Planta *Podophyllum peltatum*.

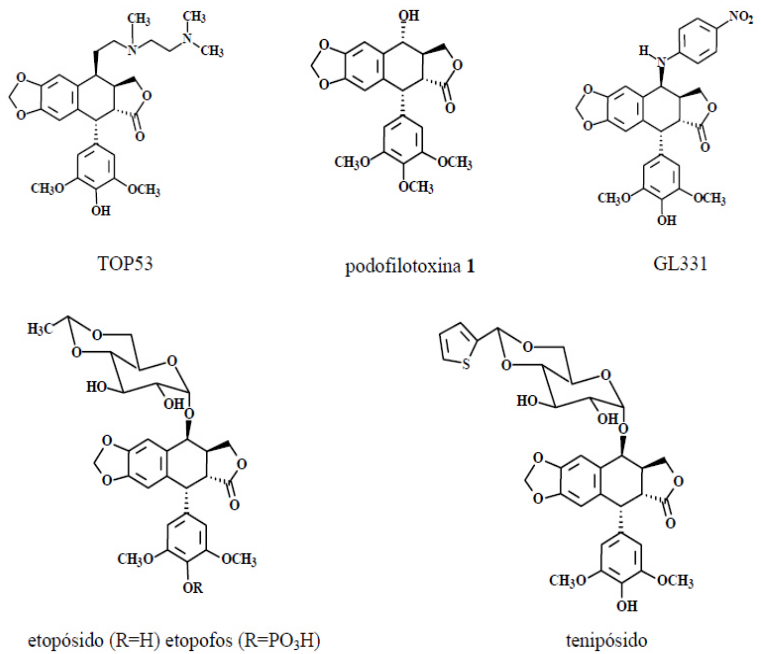


Fig.7. Fármacos análogos a la podofilotoxina1, Etopósido y Tenipósido y sus derivados (Abad-Reyes *et al.*, 2008).

Extractos de plantas con actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo*

En un estudio realizado por Laundry de Mesquita y colaboradores en el 2009, se investigó el potencial citotóxico de 412 extractos de plantas obtenidos mediante la extracción con etanol, hexano, diclorometano y con una solución hidroetanólica, dichos extractos fueron derivados de 50 plantas brasileñas utilizadas en la medicina tradicional pertenecientes a 21 familias, se probaron contra líneas de células tumorales en cultivo. Sus resultados muestran que de los 412 extractos, 28 presentan un efecto antiproliferativo importante, inhibiendo por lo menos el 85% de la proliferación de las células tumorales a 50 $\mu\text{g/mL}$ en contra de cuatro líneas tumorales carcinoma de colon humano (HCT-8), carcinoma mamario (MDA-MB-435), cerebro (SF-295) y Leucemia (HL-60). De los 28 extractos, 19 mostraron un Índice de Concentración media menor de 30 $\mu\text{g/mL}$, 14 mostraron un IC_{50} menor a 20 $\mu\text{g/mL}$ y 6 menores a 5 $\mu\text{g/mL}$ en contra de las cuatro líneas celulares. (Laundry de Mesquita *et al.*, 2009).

En Colombia, Betancur-Galvis y sus colaboradores encontraron en el 2002 que seis de diez especies de *Euphorbia* empleadas en el tratamiento de cáncer presentaron citotoxicidad en células HeLa. Mientras tanto en México se encontró que los extractos de hexano, acetato de etilo, y metanol de *Cuphea aequipetala* (Lythraceae), conocida comúnmente como “Hierba del Cáncer”, presentan una ligera citotoxicidad en una línea celular de cáncer de cérvix (UISO-SQC1) (Waizel-Bucay *et al.*, 2003), mientras que las fracciones obtenidas con acetona-agua presentaron una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de 0.418 y 2.40 $\mu\text{g/mL}$ en la línea DU-145 de carcinoma de próstata (Vega-Ávila *et al.*, 2004). Por otro lado se encontró que el extracto etanólico crudo de hojas de *Cupressus lusitanica* Klotzsch (Cupressaceae) resultó ser citotóxico en un panel de líneas celulares de cáncer, observándose que la vía de muerte celular fue por apoptosis (López, 2001; López *et al.*, 2002).

Mena-Rejon y sus colaboradores en el 2009 trabajaron con 9 plantas de la península de Yucatán (México), empleadas comúnmente por mayas, encontraron que de los 25 extractos metanólicos obtenidos, 16 resultaron tener una citotoxicidad significativa.

Dichos extractos fueron retados contra cuatro líneas celulares de cáncer humano: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de laringe (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma escamoso de cérvix (SiHa), y una línea de células normales, las células de riñón canino (MCDK). A dichos extractos se les calculó tanto el índice de actividad citotóxica media como el índice de selectividad, el cual se define como la relación de la citotoxicidad en células normales entre las células cancerosas

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ células normales}}{CC_{50} \text{ líneas celulares de cáncer}}$$

De los 16 extractos, 4 mostraron actividad contra células HEP-2; 5 en células HeLa, 8 en las células SiHa y 4 mostraron efectos citotóxicos tanto en SiHa y HeLa. Ninguno de los extractos ensayados mostraron una citotoxicidad significativa en las células KB y solo un extracto mostró alta actividad citotóxica sobre las células normales (MDCK). El extracto de corteza de raíz de *Hamelia patens* fue el que mostró mayor citotoxicidad contra células HeLa (13µg/mL) y en células SiHa (22µg/mL) (Mena-Rejon *et al.*, 2009).

Otro trabajo de investigación realizado en México, fue elaborado por Villavicencio y colaboradores en el 2008, en el estado de Hidalgo con tres plantas de la región *Juniperus deppeana*, *Solanum rostratum* y *Bidens odorata*, utilizadas para el tratamiento de heridas, úlceras, tumores y cáncer de matriz. El extracto etanólico de *J. deppeana* fue el que presento mayor citotoxicidad con CI₅₀ de 4.63µg/mL seguida de *S. rostratum* con IC₅₀ de 127.5 µg/mL, mientras que *B. odorata* no mostró actividad citotóxica (Villavicencio *et al.*, 2008).

También hay estudios que comienzan con pruebas *in vitro* y los completan en modelos murinos como por ejemplo el trabajo realizado por Sacoman y sus colaboradores donde prueban la actividad citotóxica del extracto crudo diclorometano (DCE), obtenido a partir de las partes aéreas de *Pothomorphe umbellata*. Este extracto se evaluó frente a nueve líneas celulares de cáncer humano (cáncer de mama (MCF-7), cáncer de ovario resistente a múltiples drogas (NCI ADR / RES), cáncer de ovario (OVCAR-3), cáncer de

próstata (PC-3), cáncer de colon (HT-29), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NCI-H460), renal (786-O), melanoma (UACC-62), leucemia (K-562). El DCE presentan actividad antiproliferativa contra todas las líneas celulares a bajas concentraciones (entre 4,0 y 9,5 µg/mL). Además también se probó el extracto *in vivo* inyectando intraperitonealmente 100, 200 y 300mg/Kg del extracto, la supervivencia en número y la duración de la vida de los animales aumentaron al menos un 45% con 100 y 200 mg/Kg del extracto y 50% con el tratamiento de 300 mg/Kg, (8 animales por grupo) (Sacoman *et al.*, 2008).

Es de importancia mencionar que no existen muchos trabajos *in vivo* donde se induzca el tumor y se prueben extractos de plantas medicinales. En México diversas especies de la flora medicinal son utilizados popularmente para el tratamiento de enfermedades como el cáncer sin embargo muy pocas de ellas se han estudiado científicamente.

Generalidades de la Hierba del Cáncer (*Cuphea aequipetala*)

Aspectos etnobotánicos y etnomédicos

Cuphea aequipetala Cav. es una de las plantas de origen americano utilizada en la herbolaria mexicana (Argueta *et al.*, 1994), cuyas hojas y tallos han sido empleados empíricamente en el tratamiento de golpes, diarreas, padecimientos estomacales, paperas, baños post-parto, lavado de lesiones, para disminuir fiebre, en tumores y heridas cutáneas de difícil cicatrización y en contra de la caída del cabello (Waizel-Bucay *et al.*, 2003). Esta planta recibe el nombre popular de hierba del cáncer, alfilerillo o árnica falsa, entre otros (Aguilar-Rodríguez, *et al.*, 2012). Aguilar-Rodríguez y colaboradores, realizaron entrevistas a habitantes de un lugar llamado Villas de Carbón en el Estado de México, constatando que esta planta aun es empleada en la herbolaria mexicana e indicaron los porcentajes de los usos medicinales que los lugareños le dan a *C. aequipetala*, los cuales se muestran en la figura 8.

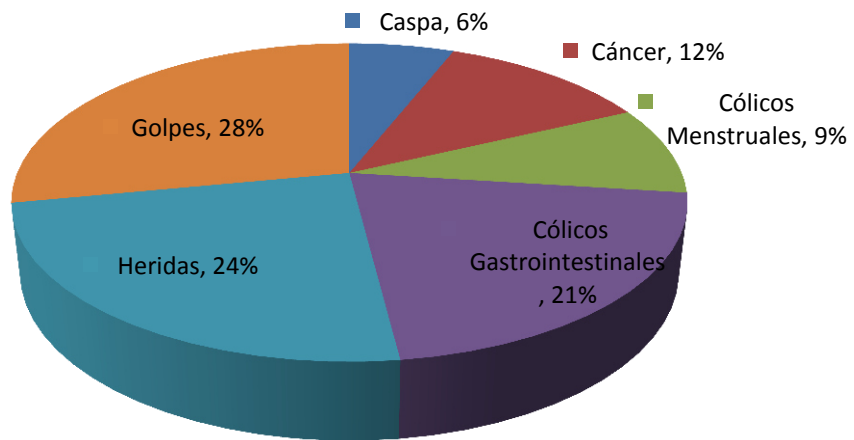


Fig. 8. Porcentajes de los usos medicinales de *Cuphea aequipetala* reportados por los habitantes de Villa del Carbón, Estado de México (Aguilar-Rodríguez, *et al.*, 2004).

La especie se agrupa en el orden de Myrtales dentro de la familia *Lythraceae*, posee Sinonimia botánica. *Parsonsia aequipetala* (Cav.) Es una hierba de 40cm a 1m de altura, su tallo es generalmente postrado y con filamentos de color violáceo o rojizo, sus hojas son opuestas, en forma de lanza, con la parte inferior más ancha y el envés también con filamentos; tiene flores que salen de entre la unión de la hoja y el tallo, de color púrpura o rosa purpúreo, en forma de trompeta; en México se distribuye principalmente en la zona centro y sur, fuera del país se registra hasta Guatemala (Aguilar-Rodríguez, *et al.*, 2012). Crece en climas cálido, semicálido, semiseco y templado; está asociada a terrenos de cultivo de temporal, bosques tropicales caducifolios y subcaducifolio, matorral xerófilo, pastizal y bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero. (Waizel-Bucay *et al.*, 2003).



Fig. 9. Flor, tallo y hoja de la planta *Cuphea aequipetala* “hierba del cáncer”.

Aspectos químicos y farmacológicos

Con respecto a la composición química, Maximino Martínez reporta en su libro “*Las plantas Medicinales de México*”: que “la planta contiene grasa sólida, concha, aceite esencial, ácido tónico, clorofila y material colorante amarillo, un glucósido, resina ácida y glucosa, principios pépticos, dextrina y sus análogos, almidón, sales minerales, celulosa y leñosa” (Baytelman, 1992).

En ensayos más recientes un extracto de acetona-agua de *C. aequipetala* mostró la presencia de taninos hidrolizables (elagitaninos) y condensados, así como de flavonoides y compuestos fenólicos (Vega-Ávila *et al.*, 2004). También se conoce *C. aequipetala* contiene manitol (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2012), el cual también ha sido identificado de especies relacionadas como *C. writii* (Pérez-Castorena y Maldonado, 2003), *C. epilobifolia*, *C. infundibulum*, y *C. carthagenesis* (González *et al.*, 1994), Waizle-Bucay y colaboradores encontraron en el 2003 que el extracto metanólico de la Hierba del cáncer presenta alcaloides, flavonoides, glucósidos y lactonas sesquiterpénicas y consideran que dichos compuestos pueden ser los responsables de su actividad biológica. De igual forma se reporta que un extracto acuoso de *C. aequipetala* contiene aldehídos y cetonas, carbohidratos, cumarinas, cloruros, hidrocarburos insaturados, p-benzoquinonas, además de los ya mencionados flavonoides y taninos (Uscanga-Palomeque, 2012).

Los estudios relacionados con actividad biológica realizados por Villarreal y colaboradores en 1992 muestran que las fracciones del extracto obtenidas con hexano, cloroformo y etanol procedentes de las hojas de *Cuphea aequipetala* tienen actividad citotóxica sobre las células cancerosas: P388 (leucemia murina), KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y KB-VI (células de carcinoma nasofaríngeo resistentes a vincristina). Sin embargo Instituto Nacional del Cáncer de E.U.A., (Suffness & Pezuto, 1991) reportó que estos extractos fueron inactivos en las líneas celulares evaluadas.

Por otro lado Vega-Ávila y colaboradores en el 2004 reportaron que el extracto de acetona-agua de *Cuphea aequipetala* presenta actividad citotóxica *in vitro* contra las

línea tumorales humanas DU-145 (próstata) y HCT-15 (colón) con $DE_{50} = 8.15$ y $18.70 \mu\text{g/mL}$ (Vega-Ávila *et al.*, 2004). Mientras que en un trabajo realizado con el extracto acuoso de esta hierba muestra que la Concentración Efectiva media para la líneas celulares de melanoma murino (B16F10) es de $261.52 \mu\text{g/mL}$, en el carcinoma mamario humano (MCF7) la CE_{50} fue de $301.93 \mu\text{g/mL}$ y en la línea celular de cáncer de pulmón (INER51) resultó de $487.20 \mu\text{g/mL}$ (Uscanga-Palomeque, 2012).

Muerte celular

La muerte celular programada (MCP) es una vía evolutiva conservada necesaria en el desarrollo embrionario y para mantener la homeostasis de los tejidos adultos. Surge como una respuesta fisiológica normal a diversos estímulos, incluyendo daños irreparables al ADN. (Sjostrom y Bergh, 2001). Así pues defectos en el proceso de MCP contribuye a enfermedades en las cuales ocurre la acumulación celular como es el caso del cáncer.

Tipos de Muerte Celular Programada

- *Tipo 1: Apoptosis.*

Se manifiesta por formación de ampollas en la membrana, la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática, activación de caspasas, condensación nuclear y picnosis, con reducción del volumen citoplasmático, fragmentación celular tardía y fagocitosis.

La activación bioquímica de la apoptosis se produce a través de dos vías generales: la vía intrínseca, originando de la liberación de citocromo C y la activación asociada de la caspasa 9 y la vía extrínseca, proveniente de la activación de los receptores de muerte de la superficie celular, tales como Fas y que resulta en la activación de la caspasa 8 o 10. Una tercera vía, se origina en el retículo endoplasmático y resulta en la activación de la caspasa 12 y 9, que convergen en la activación de la caspasa 3, la caspasa efectora (Castro-Obregón *et al.*, 2004).

- *Tipo 2: Autofagia.*

Es un proceso en el cual citoplasma y organelos son secuestrados en vesículas con membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y reciclaje de macromoléculas. Tiene funciones homeostáticas y de biosíntesis. Existen mecanismos de regulación similares entre la apoptosis y la autofagia, la vía de señalización que implica la quinasa PI3, AKT, quinasas mTOR, que es estimulada por las señales de supervivencia para bloquear la apoptosis, inhibe la autofagia de manera similar; cuando las señales de supervivencia son insuficientes, la vía de señalización de PI3K es regulada negativamente, con el resultado de que la autofagia y / o la apoptosis puede ser inducida (Hanahan y Weinberg, 2011).

Otra interconexión entre estos dos programas reside en la proteína beclin-1, que se ha demostrado por estudios genéticos ser necesaria para la inducción de la autofagia. Proteínas BH3 sensoras de estrés pueden desplazar Beclin- 1 de su asociación con Bcl-2 / Bcl-X_L, lo que permite la liberación beclin-1 para activar la autofagia, como pueden liberar a Bax y Bak para activar la apoptosis. Por lo tanto, la transducción de las proteínas de estrés BH3 (por ejemplo, Bid, Bad, Puma) pueden inducir la apoptosis y / o la autofagia dependiendo del estado fisiológico de la célula (Hanahan y Weinberg, 2011).

- *Tipo 3: Necrosis o Muerte citoplasmática.*

Se caracteriza por una desintegración general con pérdida de los organelos.

La definición de necrosis es negativa, ya que se considera como tal aquel tipo de muerte sin signos de apoptosis o autofagia. Algunas características son: el volumen celular aumentado, núcleo fragmentado con ADN fragmentado de forma irregular con patrón de barrido, la membrana celular conserva su asimetría fosfolipídica y pierde su integridad, el citoesqueleto se desorganiza y el citoplasma se vierte al espacio intersticial fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana (De Toro, 2006).

Necroptosis

Es un mecanismo de muerte que no requiere la activación de caspasas o la presencia de los miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos Bax o Bak, posee morfología necrótica, esta estimulada por TNF- α , ligando de CD95 o TRAIL, en presencia de inhibidor de caspasa de amplio espectro. Esta vía de muerte celular puede ser inhibida por medio de la sustancia Necrostatin-1, una sustancia derivada del indol, que Degterev y colaboradores aislaron en 2005, la cual funciona mediante la inhibición de la actividad quinasa de receptor de interacción con proteína quinasa 1 (RIPK1), por otro lado Moujalled y colaboradores mencionan que RIPK1 no es indispensable para que ocurra la necroptosis, pero que RIP3K (receptor de interacción con proteína quinasa 3) y MLKL (quinasa de linaje mixto de dominio similar) son necesarios para este tipo de muerte celular (Moujalled *et al.*, 2014).

Piroptosis

Esta vía de muerte celular es dependiente únicamente de la caspasa-1. Esta caspasa no está involucrada en la muerte celular apoptótica y su función es procesar los precursores de las citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-18, activándolos. La activación de la caspasa-1 lleva a la fragmentación del ADN y a la lisis celular, ambos. Se puede considerar a la piroptosis como un tipo de muerte necrótica dependiente de la caspasa-1 (De Toro, 2006).

Paraptosis

La Paraptosis se define como la vacuolización citoplasmática asociada con aumento de volumen mitocondrial y del retículo endoplasmático el cual no responde a la inhibición de las caspasas y no existe formación de cuerpos apoptóticos u otras características morfológicas de esta. Es mediada por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAKP) y que puede ser activada por miembros de la familia TNF como TAJ/TROY y por el receptor del factor de crecimiento tipo insulina. Es posible inhibir la paraptosis

por medio de la proteína AIP1/Alix, que interactúa con otra relacionada a muerte, ligante de calcio ALG-2, sugiriendo que este tipo de muerte es totalmente distinta de la apoptosis. Existen pocos estudios sobre este tipo de muerte, por lo que aun su regulación es desconocida (Sperandio *et al.*, 2004).

Genes de proliferación y muerte

Gen *p53*

El gen *p53* es conocido como “el guardián del genoma” ya que es un supresor de tumor que desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular y su producto (la proteína) está involucrado en la regulación negativa del ciclo celular. (Chang *et al.*, 1993). Dicho gen que se ubica en el brazo corto del cromosoma 17 humanos y que está compuesto por 5 dominios y 11 exones conservados evolutivamente (Soussi, De-Fromental y May, 1990). El gen *p53* esta mutado en más del 50% de las neoplasias humanas, las alteraciones se dan entre los residuos aminoacídicos 130 y 290, siendo en su mayor parte mutaciones de sentido equivocado que dan como resultado una proteína alterada incapaz de desempeñar sus funciones normales. Siendo así un cofactor para desarrollar neoplasias debido a su mutación (Soussi, De-Fromental y May, 1990).

Genes *bcl-2*

Una familia de genes que contribuyen en la activación y represión de la apoptosis son los genes de la familia *bcl-2*. La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 previene la apoptosis, considerada por lo tanto como una molécula antiapoptótica (Hanada, *et al.*, 1995). Por el otro lado, la proteína Bax actúa como un inductor de la apoptosis al influir en la liberación del citocromo C por la mitocondria activando así a las caspasas (proteínas efectoras de la muerte celular) (Eskes *et al.*, 1998). Sin embargo, la regulación de la apoptosis parece ser más compleja, debido a que existe evidencia de que algunos miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 son capaces de actuar en vías independientes para promover o reprimir la apoptosis (Knudson y Korsmeyer, 1997).

También cabe mencionar que la familia de Bcl-2 participa en la muerte celular tipo 2 (Autofagia), ya que la proteína Beclin-1, la cual es un miembro de la subfamilia que posee solo el dominio BH3, es necesaria para la inducción de la autofagia, su dominio BH3 le permite unirse a las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 / Bcl-X_L, cuando Beclin-1 es liberada de dicha unión, la autofagia se dispara, lo anterior indica que la familia de proteínas Bcl-2 no sólo regula la apoptosis, sino también controla la muerte celular programada no apoptótica que depende de los genes autofagia (Hanahan y Weinberg, 2011).

Gen del Tumor de Wilm's (*wt1*)

El gen de *wt1* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11p13 (Call *et al.*, 1990) y las mutaciones en dicho gen fueron inicialmente descubiertas en el tumor de Wilm's (TW), un cáncer renal pediátrico que afecta células precursoras embrionarias pluripotentes. El dominio N-terminal de WT1 está compuesto de secuencias ricas en prolina-glutamina y está involucrado en interacciones ARN y proteína, este dominio es crítico para la función de regulación transcripcional ya que contiene dominios de represión y activación. El dominio C-terminal está formado por cuatro dedos de zinc tipo Kruppel Cisteína²-Histidina², que representan su dominio de unión a ADN, pero también está involucrado en interacciones ARN y proteína. (Menke *et al.*, 1998).

Estudios han demostrado que WT1 es capaz de modular el mecanismo de apoptosis, debido a su asociación con bcl-2 y P53. El promotor del gen *bcl-2* es activado transcripcionalmente a través de un sitio de unión a WT1 de alta afinidad, sugiriendo que WT1 exhibe un potencial oncogénico a través de la regulación positiva de genes anti-apoptóticos (Mayo *et al.*, 1999). Por otro lado la asociación física entre WT1 y p53 puede modular sus respectivas propiedades regulatorias de la transcripción. En presencia de p53 de tipo silvestre, WT1 actúa como represor y en su ausencia como activador. Además se sabe que WT1 ejerce un efecto cooperativo en la transcripción activada por P53, ya que WT1 estabiliza a la proteína P53 mediante sus dedos de zinc 1 y 2. (Scharnhorst *et al.*, 2000). También se ha encontrado que WT1 activa o reprime diferentes genes, que se muestra en la siguiente tabla

Tabla 3. Blancos en los que actúa WT1 y efecto que provoca. (Yang *et al.*, 2007)

BLANCO	EFEECTO
F. de crecimiento	
<i>Anfíregulina</i>	Activación
<i>Factor estimulante de colonias-1(CSF-1)</i>	Represión
<i>F.C. de la insulina II (IGF-II)</i>	Activación/Represión
<i>F. C. derivado de plaquetas (PDGF)</i>	Represión/Activación
<i>F.C. transformante (TGF)</i>	Represión
Enzimas	
<i>Transcriptasa reversa de telomerasa Humana (TERT)</i>	Represión
<i>Descarboxilasa de ornitina</i>	Represión
Receptores	
<i>R. de andrógeno (AR)</i>	Represión
<i>R. del factor de crecimiento epidermal (EGFR)</i>	Represión
<i>R. de insulina (IGFR)</i>	Represión
<i>R. de ácido retinoico (RAR)</i>	Represión
F. de transcripción	
<i>c-Myb</i>	Represión
<i>c-Myc</i>	Activación/Represión
<i>Ciclina E</i>	Represión
<i>Ciclina G1, IGFBP-4</i>	Activación
<i>P-21</i>	Activación
<i>Pax-2</i>	Represión
Célula Madre Embrionaria	
<i>E-cadherina humana</i>	Incremento
<i>Trombospondina 1(TSP-1)</i>	Represión
Otros	
<i>Bcl-2</i>	Activación/Represión
<i>Eritropoyetina</i>	Activación
<i>WT1</i>	Activación/Represión

Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. El proceso involucra la participación de células vasculares endoteliales, las cuales entran en división por estímulos con factores de crecimiento y algunas otras moléculas como adenosina, 1-butiril glicerol y nicotinamida. También participan células no vasculares, enzimas proteolíticas que disocian membranas basales y matriz extracelular (Vera-Janavel *et al.*, 2006). La angiogénesis es fundamental para la reproducción, desarrollo y reparación de sistemas. Sin embargo, también es central para el crecimiento del cáncer. Esto es, sin vasos sanguíneos, las células son incapaces de crecer en grandes tumores.

La angiogénesis tumoral es la proliferación de un grupo de vasos sanguíneos que penetran en el interior del tumor, aportándole el oxígeno y nutrientes indispensables para su replicación y crecimiento. Los estímulos de la angiogénesis tumoral son la hipoxia, la inflamación y las lesiones genéticas de los oncogenes o los supresores tumorales que alteran la expresión génica de la célula tumoral. (National Cancer Institute, 2012).

Algunos de los genes de factores de crecimiento más estudiados involucrados en la angiogénesis son:

- **El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).** El VEGF se une al receptor VEGFR-1 y VEGFR-2, y es capaz de inducir proliferación, migración y formación tubular con células endoteliales. Tiene nueve isoformas posibles de diferente tamaño, las cuales se denominan VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165b, VEGF183, VEGF206, VEGF121, VEGF165 y VEGF189, las últimas tres isoformas son difusibles y son secretadas por la mayoría de las células (Testa *et al.*, 2008). Con ayuda de ratones transgénicos que sobreexpresan VEGF se han podido observar las funciones de este gen, estos ratones muestran tener abundante angiogénesis a nivel cutáneo y una condición de piel con el proceso inflamatorio, también se observó que estos ratones tienen un crecimiento experimental del tumor más rápido en comparación en ratones

tipo silvestre. En base a estos y otros resultados se observó que el VEGF está altamente correlacionado con la progresión tumoral y supervivencia (Ferrara, 2002).

- **El factor de crecimiento de respuesta temprana (EGR-1).** Este gen codifica para una proteína nuclear que funciona como regulador transcripcional, pertenece a la familia de las proteínas con dedos de zinc tipo C2H2. Los productos de los genes blanco que activa son necesarios para la diferenciación y la mitogénesis. En ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, en tejidos de próstata, mama y colón, se observó que EGR1 se une de manera específica al promotor del gen de las heparanasas, enzimas que degradan la matriz extracelular permitiendo la movilidad de las células. Por otro lado, en un ensayo de trans-activación *in vitro*, se observó que la sobreexpresión de EGR1 en células de melanoma actúa como represor transcripcional de las heparanasas, demostrando que el gen puede tener un rol como activador y represor de la angiogénesis dependiendo del tipo tumoral donde se exprese (De Mestre *et al.*, 2005).

JUSTIFICACIÓN

Entre los principales problemas del cáncer se encuentran: la ausencia de tratamiento específico, sobre todo en etapas avanzadas (cuando existe metástasis), y la toxicidad y agresividad de los métodos para tratar de erradicar esta enfermedad. Sumado a lo anterior, se sabe que la incidencia de esta enfermedad en nuestro país y en el resto del mundo va en aumento, llevándonos a la búsqueda de tratamientos alternativos para ayudar a combatir los diferentes tipos de neoplasias. México cuenta con una cultura herbolaria ancestral y gran biodiversidad de plantas medicinales, a las cuales no se les ha corroborado sus efectos anticancerígenos representando un gran potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos antineoplásicos. En este trabajo se busca determinar el efecto tóxico de los extractos acuoso y metanólico de *Cuphea aequipetala* “hierba del cáncer” *in vitro*, sobre varias líneas celulares de cáncer e *in vivo*, en un modelo murino de melanoma. Buscando que dichos extractos sean una terapia alternativa o se empleen como adyuvantes de tratamientos quimioterapéuticos para disminuir los efectos dañinos de los tratamientos convencionales.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólico y acuoso de *C. aequipetala* presentan actividad citotóxica, mediante la modulación de genes apoptóticos, de proliferación y angiogénicos, sobre diferentes líneas celulares de cáncer así como actividad antineoplásica *in vivo* en un modelo murino de melanoma.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad de los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala* y su efecto en la expresión de genes apoptóticos, de proliferación y angiogénicos en las líneas celulares, así como la evaluación del efecto antineoplásico en un modelo de melanoma murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos acuoso y metanólico de *Cuphea aequipetala*.
2. Determinar la citotoxicidad de los extractos acuoso y metanólico en las diferentes líneas celulares de cáncer.
3. Determinar la expresión génica involucrada en proliferación y apoptosis y angiogénesis celular.
4. Determinar la expresión de proteínas involucradas en proliferación y apoptosis celular.
5. Evaluar la actividad de los extractos sobre la masa tumoral en un modelo murino.
6. Evaluar la sobrevivencia de los ratones tratados con los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas Celulares

Se emplearon las líneas de melanoma murino ATCC B16F10, la línea de carcinoma pulmonar humano, INER51 donada por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, del ATCC se obtuvieron las siguientes líneas celulares: MCF7, línea celular de cáncer de mamá humano, HEPG2, hepatocarcinoma humano, así como una línea transformada de riñón humano HEK293, dichas células se trabajaron y preservaron en cajas de cultivo celular con medio modificado de Dulbecco's Eagle's (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado y antibiótico antimicótico 1X; los cultivos se mantuvieron en una atmósfera con humedad relativa de 50% con 5% de Dióxido de Carbono a una temperatura de 37°C (en la incubadora Thermo scientific, HEPA class 100; el medio de cultivo de las líneas celulares se cambiaba dos veces a la semana, en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León).

Material vegetal

La planta *Cuphea aequipetala* comúnmente denominada Hierba del cáncer, se obtuvo en el mercado Sonora del Distrito Federal.

Obtención del extracto acuoso

Se hirvieron 300 mL de agua destilada por 10min y se dejó enfriar por 5min, pasado el tiempo se le agregó el agua caliente a 100g de la planta, previamente molida y pesada, se dejó reposar por 15min, posteriormente se removió el material insoluble por centrifugación a 10,000 rpm durante 10min a 4°C y se pasó el sobrenadante por filtros de papel Whatman con un tamaño de poro de 125mm, posteriormente el filtrado se liofilizó, se pesó el liofilizado siendo este el peso seco del extracto acuoso, el cual se disolvía en el agua destilada necesaria para obtener una solución stock de 25mg/mL, empleando los cálculos necesarios y se esterilizaba mediante el uso de filtros con un

tamaño de poro de 0.2µm, después de esta segunda filtración la solución stock resultó en 20mg/mL. Es decir un rendimiento del 80%.

Obtención del extracto metanólico

Se colocaron 100g de la planta molida en un matraz y se le agregaron 300mL de metanol grado reactivo, el matraz se cubrió con papel aluminio y se dejó macerar por 48h a temperatura ambiente, se retiró el material insoluble por centrifugación a 10,000rpm por 10min a 4°C, el sobrenadante se hizo fluir a través de papel filtro Whatman con poro de 125mm, se evaporó el metanol por medio de incubación a 50°C, obteniendo un sólido, este será el peso seco del extracto metanólico el cual se reconstituyo en agua destilada necesaria para obtener una solución stock de 25mg/mL y se esterilizó mediante el uso de filtros con un tamaño de poro de 0.2µm, al filtrarse de nuevo, la concentración real resulto en 17mg/mL. Un rendimiento del 68%.

Ensayos *in vitro*

Análisis Morfológico de las células tratadas con los extractos empleando el microscopio invertido

La morfología de las diferentes líneas celulares se examinó con el microscopio invertido, antes y después de ser tratadas con los extractos tanto a las 24h, 48h como a las 72h de exposición y se registraron los datos.

Ensayo de citotoxicidad

El efecto de los extractos se probó en las líneas celulares B16F10, MCF7, HEPG2, HEK293 e INER51; 3×10^6 células fueron sembradas en placas de 96 pozos. Posteriormente se incubaron por 24h, pasado el tiempo se retó a diferentes concentraciones (0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL y 2mg/mL) del extracto acuoso y metanólico.

Posteriormente a las 72h se evaluó la viabilidad de las células por medio de la técnica de reducción de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) la cual consiste en la preparación de una solución de MTT 5 mg/mL en buffer PBS1X, se añadió 20µL por pozo y se incubo por 50min a 37°C, pasado el tiempo se retiró el sobrenadante decantando la placa sobre papel secante sin golpear la placa para evitar perdida de sales y se añadieron 100µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) por pozo, posteriormente se incubaron por 10min a temperatura ambiente y se leyó al espectrofotómetro a 570nm.

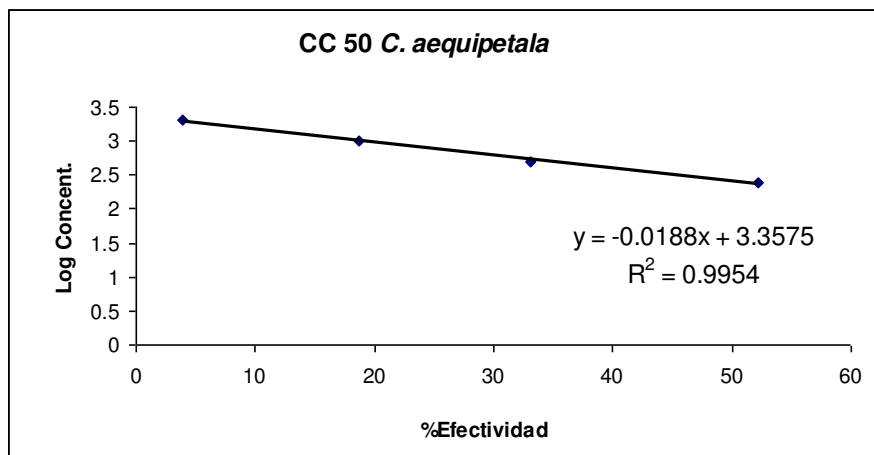
Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficaron incluyendo la desviación estándar.

Determinación de la Concentración Citotóxica 50 del extracto acuoso y metanólico en las diferentes líneas celulares.

Para calcular la CC_{50} de cada extracto se utilizó el logaritmo de las diferentes concentraciones empleadas en unidades de microgramo/mililitro para cada extracto y línea celular, obteniendo la ecuación de la pendiente, en la cual se sustituirá el valor de 50, debido a que este es el porcentaje de efecto que se busca calcular, posteriormente se obtiene el antilogaritmo del resultado para tener la concentración en µg/mL. A continuación se presenta un ejemplo gráfico con la línea celular B16F10 expuesta al extracto de *C. aequipetala*

Tabla 4. Ejemplo para calcular la CC₅₀ de los extractos empleados

<i>Cuphea aequipetala</i>			B16F10
mg/mL	µg/mL	Log Concentración	% Viabilidad Celular
0			
0.25	250	2.40	52.15
0.5	500	2.70	33.08
1	1000	3.00	18.76
2	2000	3.30	3.89



Formula de la pendiente-intercepción:

$$y = mx + b$$

$$\text{Log CC}_{50} = m (50) + b$$

$$\text{CC}_{50} = \text{Potencia base 10 o Antilog} (\text{log CC}_{50})$$

Se sustituye X en la ecuación de la pendiente:

Log CC₅₀ = ((-0.0188*50)+3.3575)) resultando **2.4175** este es un logaritmo, por lo tanto se calcula su antilogaritmo para obtener la CC₅₀ teórica.

$$\text{CC}_{50} = \text{POTENCIA (10, 2.4175)} = 261.517045 \mu\text{g/mL}$$

Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP)

Como un control para probar la citotoxicidad de los extractos en células normales humanas, se obtuvieron 20ml de sangre periférica de donadores sanos por punción venosa, colectada en tubos con EDTA, para evitar la coagulación. Las CMSP se aislaron por medio de un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) por centrifugación a 1600rpm durante 30min a 20°C, posteriormente fueron lavadas por dos ocasiones con 10mL PBS1X a 1600rpm por 10min y se descartó el sobrenadante, de inmediato se resuspendió el pellet en medio DMEM adicionado con 10% de SFB y antibiótico –antimicótico 1X (Invitrogen). Posteriormente se sembraron en una microplaca de 96pozos ajustando a 2.5×10^6 células por pozo y se retaron tanto con el extracto acuoso como con el metanólico, se incubaron por 24h en una atmosfera con humedad relativa de 50% con 5% de CO₂ a 37°C (Incubadora Thermo scientific, HEPA class 100), posteriormente se realizó el ensayo de citotoxicidad.

Ensayo clonogénico

Se sembraron 100 células de la línea B16F10 por pozo en placa de 6 para los controles y 500 células para ser retadas con los tratamientos, se dejaron incubar a condiciones previamente descritas por 24h, pasado el tiempo se retiró el medio y se adicionaron 2mL medio fresco a las diferentes concentraciones del extracto metanólico y se incubo por 24h, posteriormente se retiró el medio con tratamiento y se agregaron 3mL de medio nuevo y se dejó incubar por 8 días a 37°C en una atmosfera de humedad al 50% y CO₂ al 5%, revisando el crecimiento de las células cada 48h. Concluyendo los 8días se retiró el medio y se fijaron las células con 0.5 mL de Metanol: Ácido acético (3:1) y se dejaron incubando a -20°C durante 30min, después se retiró el metanol: ácido acético y se lavó la placa con 1 mL de PBS1X, después de retirar el buffer se adicionó 1mL del colorante cristal violeta y se incubó a 37°C durante 4 h, pasado el tiempo se retiró el tinte y fueron realizados 3lavados con PBS1X para quitar el exceso de cristal violeta, a continuación se procedió a contar cada colonia, se considera una colonia a un grupo de más de 50 células.

La fórmula para tener datos cuantitativos son:

$$\text{Eficiencia de Plaqueo} = \frac{\text{\#de colonias contadas en el control}}{\text{\# de células sembradas}} \times 100\%$$

$$\text{Fracción de sobrevivencia} = \frac{\text{\#de colonias formadas después del tratamiento}}{\text{\# de células sembradas} \times EP}$$

Ensayo de la Fragmentación del ADN

Mediante esta prueba se determinó la integridad del ADN, se colectaron 1×10^6 células tratadas previamente con la concentración citotóxica media, en tubos eppendorf y fueron centrifugados a 4000rpm durante 5min, se lavaron con buffer PBS1X y se centrifugó de nuevo, inmediatamente se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 10 mM, pH 8.0 y 0.5% Triton X-100), incubándolo posteriormente por 10min a 4°C y centrifugando a 16000g por 30min. Se tomó el sobrenadante y se le adiciono 2 μ L de RNAsa A (20mg/ml), seguido de una incubación de 60min a 37°C y después fue incubado con 5 μ L de proteinasa K (20mg/mL) a las mismas condiciones. El ADN en el sobrenadante se precipito toda la noche a -20°C mediante la adicción de 20 μ L de NaCl 5M y 120 μ L de isopropanol. Posteriormente hubo una centrifugación a 16000g durante 30min y se descartó me sobrenadante y el pellet se lavó con 1mL de Etanol al 75%, centrifugándolo a 7500g por 5min, el pellet se resuspendió en 30 μ L de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), seguido del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.0%, el gel fue teñido con bromuro de etidio y el patrón de ADN resultante se observó y fotodocumento bajo luz UV.

Determinación de la condensación nuclear por medio de la tinción de Hoescht

En cajas de 6 pozos se colocaron cubreobjetos estériles y se sembraron 6×10^4 células por pozo, se dejaron incubar por 24h a 37°C, HR 50% y 5% CO₂, pasado el tiempo se retiró el medio cuidadosamente y se adicionó nuevo medio con la CC50, las placas se

incubaron durante diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72h), se retiró el medio de los pocillos y se lavaron con 1mL de PBS1X, posteriormente se fijaron con 1 mL de Paraformaldehído (PFA) 4% durante 15min a temperatura ambiente, se retiró el PFA4% y se lavaron dos veces con PBS1X, se prosiguió a teñir los cubreobjetos con 200 μ L del colorante de Hoechst 33258 (0.5 μ g/mL) durante 5min, enseguida se descartó el exceso de colorante, mediante tres lavados con PBS1X y se procedió al montaje del cubreobjetos en un portaobjetos con ayuda de una solución de glicerol: agua (50:50), se dejó secar por 48h a 4°C, al finalizar el tiempo se observaron las preparaciones en el microscopio de fluorescencia en la región UV (280 a 315nm).

Las imágenes se analizaron mediante el software ImageJ y los ensayos se realizaron por triplicado y se graficaron incluyendo la desviación estándar.

Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo usando anexina y yoduro de propidio

La citometría de flujo fue empleada para dilucidar el tipo de muerte celular, para ello se sembraron 4×10^4 células por pozo en placas d 24 pozos, dejando que las células se adhirieran al plástico incubando 24h a 37°C, pasado dicho periodo las placas se expusieron a los tratamientos (0mg/mL, 0.135mg/mL, 0.270mg/mL, 2mg/mL y etopósido (EnZo) 1.5 mM, como control positivo) durante diferentes horas (24,48 y 72h), pasando los respectivos tiempos se recuperaron los sobrenadantes en tubos eppendorf y a los pocillos se les agregaron 150 μ L de PBS1X estéril a modo de lavado y se recuperó, posteriormente se agregaron 100 μ L tripsina dejándola por 2min y se neutralizo con 200 μ L de medio DMEM, tomando todo en el tubo eppendorf, seguido de un lavado extra con PBS1X. Una vez que se recuperaron todas las células, se centrifugaron a 1,600rpm por 15min, se desechó el sobrenadante con ayuda de la micropipeta, al pellet se le agrega una mezcla de Anexina-APC (0.25 μ L) más Yoduro de propidio (0.5 μ g/mL) en 100 μ L de Buffer de unión (HEPES 10mM pH 7.4, NaCl 140mM, Ca₂Cl 2.5mM, filtrado y almacenado a 4°C) por muestra, posteriormente se incubó en oscuridad a 4°C durante 20min, por último se leyó en el citometro de flujo

(Accuri C6 BD) y se analizó con el software proporcionado por la misma compañía Becton Dickinson. Cabe mencionar que los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron con su desviación estándar.

Ensayo de inhibición de caspasas

Este experimento se realizó de forma similar que el expuesto anteriormente, con la diferencia de la adición del inhibidor de amplio espectro Q-VD-OPh (10 μ M), 30min antes de exponer a las células a los tratamientos (0mg/mL, 0.270mg/mL y etopósido 1.50 mM, como control positivo). Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficaron incluyendo la desviación estándar.

Análisis del ciclo celular y subG1

Sembraron 1x10⁶ células por pozo en placas de 6, se dejó incubar 24h, posteriormente se retaron con la CC50 y se incubaron a 37°C en una atmosfera con HR del 50% y 5% de CO₂ durante 24, 48 y 72h, al cabo de cada tiempo se recuperaron las células en tubos eppendorf, centrifugándolas a 1,600rpm durante 15min, se retiró el sobrenadante y se fijaron con etanol al 70% con burbujeo constante durante 60seg con una posterior incubación en hielo por 30min, pasado dicho periodo se realizó la centrifugación a 1600rpm durante 10min retirando el sobrenadante, después fueron lavadas con PBS1X, centrifugadas a 1600rpm durante 10min y posteriormente resuspendidos en 100 μ L de RNAsa A (5mg/mL) + PBS1X, se incubaron por 10min, enseguida se les agregó 200 μ L de PI (1mg/mL) + PBS1X y se incubaron protegidos de la luz durante 20min y se leyeron al citometro de flujo (flujo (Accuri C6 BD) y se analizó con el software proporcionado por la misma compañía BD.

Reacción en Cadena de la Polimerasa de genes de proapoptóticos, antiapoptóticos, angiogénicos y WT1

Se extrajo el ARN total de diferentes las células B16F10, MCF7 y HEPG2, las cuales fueron sembradas en placas de 6 pozos a razón de 3×10^5 por pozo y tratadas con la CC50 y expuestas a plazos diferentes (24, 48 y 72h), terminado el tiempo, las células se recolectaron mediante el método de Trizol, posteriormente se cuantificó el ARN y se realizó la reacción de transcriptasa reversa, una vez que se obtuvieron los ADNc, se llevó a cabo la PCR, las reacciones se realizaron usando 5µL de ADNc de cada una de las muestras, 5µL de buffer 5 X (10nM de Tris-HCl, 50nM de KCl a pH final de 8.4), 0.5µL de dNTP's (10mM), 0.5µL de cada oligonucleótido (100ng/µL de sentido y 100ng/µL de antisentido), 1.5µL de MgCl₂ (25mM), 0.2 unidades de Taq polimerasa y aforando a un volumen total de 25µL por reacción.

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones usados para la reacción en cadena de la polimerasa de wt1 y genes angiogénicos, antiapoptóticos y proapoptóticos.

Oligonucleótidos utilizados para PCR		
GEN	SENTIDO	ANTISENTIDO
WT1	GATAACCACACAACGCCCATC	CACACGTCGCACATCCTGAAT
VEGF	GCGGGCTGCCTCGCAGTC	TCACCGCCTTGGCTTGTCAC
EGR-1	TGACCACAGAGTCCTTTTCTGACA	GAGAAGCGGCCAGTATAGGTGAT
Bcl-2	TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GTGTGTGTCTGTCTGTGTGTGTGA
BclX	TTGGACAATGGACTGGTTGA	GTAGAGTGGATGGTCAGTG
G3PDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Tabla 6. Condiciones usados para la reacción en cadena de la polimerasa de wt1 y genes angiogénicos, antiapoptóticos y proapoptóticos.

<i>Gen</i>	<i>Desnaturalización</i>	<i>Alineamiento</i>	<i>Extensión</i>	<i># ciclos</i>	<i>Fragmento (pb)</i>
G3PDH	94°C por 40 s	64 °C por 30 s	72°C por 40 s	35	452
VEGF	94°C por 30 s	59.2°C por 30 s	72°C por 45 s	35	512, 644 y 716
WT1	96°C por 40 s	64°C por 30 s	72°C por 40 s	35	120
EGR-1	94°C por 30 s	55°C por 30 s	72°C por 45 s	35	115
Bcl-2	94°C por 30 s	60°C por 35 s	72°C por 30 s	35	422
BclX	94°C por 45 s	60°C por 45 s	72°C por 60 s	35	BclX _S 591 BclX _L 780

Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer SB para el corrimiento y visualización de los productos de PCR de los genes estudiados. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron de 100V por 30min. Los geles se analizaron en un transiluminador con luz UV y se foto documentaron.

Extracción y cuantificación de proteínas

Se recolectaron las células de los tratamientos con los extractos de las placas de 6 pozos en tubos eppendorf y se lavaron con PBS 1X. El paquete celular fue resuspendido en buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150mM, Tris 25mM pH 7.6) e incubado en hielo por 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 5 min a 10,000rpm y el sobrenadante conteniendo las proteínas se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó por el método de Lowry en microplaca, se tomó el volumen necesario de proteínas y el resto se almaceno a -80°C, para usos posteriores.

Western Blot

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se corrieron 50µg de proteína más 4 µl de buffer de carga 6X (Tris base, SDS, azul bromofenol, B mercaptoetanol y se colocaron a 90°C en el termoblock para su desnaturalización) en un gel al 12 % de acrilamida, se corrió el gel en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (25mM Tris Base, 250mM glicina pH 8.3 y SDS 1%), se dejó correr por 20min a 40V y posteriormente se aumentó el voltaje a 100V por 1h con 40min.

Trasferencia a membrana de nitrocelulosa

Se pasaron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa; como sigue: se formó el “sándwich”, primero se colocaron esponja, papel filtro y membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Buffer de transferencia 10X: 30g Tris-Base y 144g de glicina. Sol de trabajo: 100mL de stock 10X más 200mL de metanol y 700mL de agua) para mantener humectada la membrana y a continuación se preparó el sándwich en el siguiente orden: esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa y de nuevo papel filtro y esponja y se corrió en la cámara húmeda de transferencia a 25V toda la noche a 4°C.

Inmunodetección

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución bloqueadora compuesta de TBS-Tween con leche descremada al 5% durante 1h, se retiró dicha solución y se colocaron los anticuerpos primarios correspondientes para la detección de las proteínas de Bcl-2, Bax, WT1 y β-actina como control de carga, para la normalización, (anticuerpos mWT1-F2, mBcl-2, pBax-20, mβ-actina, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), la concentración de anticuerpos primarios monoclonales fue de 1:500 en TBS-Tween 1% + leche descremada 2.5%, se incubaron durante 2h, mientras

que los anticuerpos policlonales su concentración fue de 1:1000 pasado el tiempo se retiró la solución anterior y se lavó la membrana con TBS-Tween 1% por 10min en 3 ocasiones y enseguida se añadió el anticuerpo secundario (conjugado) anti-ratón para anticuerpos monoclonales y anti-conejo para anticuerpos policlonales, diluido a 1:5000 en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubaron por 2h, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados a la membrana y finalmente se reveló por medio del sistema de quimioluminiscencia Lumi-Light Western Blotting (Roche, Pleasanton, CA, USA), el cual se agregó en partes iguales y se dejó incubando durante 5min, se eliminó el exceso de luminol y se fijó en el cassette para ser expuesto al film y revelado en el cuarto oscuro.

Ensayos *in vivo*

Material animal

Se emplearon ratones C57BL/6 negros de 7 a 8 semanas de edad (20-25g), obtenidas de Harlan México (México, D.F). Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12h luz-12h oscuridad y se alimentaron con dieta para roedores y agua *ad libitum*. Se hicieron 2 grupos de 5 ratones cada grupo. El grupo control solo tenía el tumor sin ningún extracto, el otro grupo se trató con el extracto metanólico en dosis de 25mg/mL.

Establecimiento de tumor subcutáneo en ratones

Se inocularon 5×10^5 células de B16F10 resuspendidas en 150 μ l de medio DMEM-F12 con SFB de los pases 3-12, en el flanco derecho de la pata posterior de los ratones C57BL6 por vía subcutánea. El conteo de células para la preparación de las inyecciones se hizo por el método de exclusión de azul tripán.

Esquema de tratamientos con los extractos metanólico y acuoso

Una vez implantado el tumor se procederá al tratamiento con los extractos, bajo el siguiente esquema:

Tabla 7. Esquema de tratamiento *in vivo*

Control (Agua)	Extracto Acuoso 25mg/mL	Extracto Metanólico 25mg/mL
5 Ratones	5 Ratones	5 Ratones
<i>al libitum durante 15 días</i>		
Necropsia: Extracción y medición del tumor		

El tratamiento fue administrado vía oral, por medio del agua y tratamiento *al libitum*. Los ensayos se realizarán siguiendo los lineamientos de ética y cuidado animal.

Obtención del índice tumoral

Se obtuvieron los índices tumorales en base al volumen en mm³, se extrajo el tumor al final de cada uno de los tratamientos, se tomaron las medidas con un vernier digital para obtener el volumen que reflejó el índice tumoral. Los datos obtenidos se graficaron y se sometieron a un análisis estadístico, obteniendo la diferencia significativa entre los grupos.

Evaluación de la sobrevivencia de ratones tratados y no tratados

Se corrieron experimentos paralelos con cada uno de los tratamientos y se monitorearon durante el tiempo para analizar su sobrevivencia, es decir no fueron sacrificados. Los datos obtenidos se graficaron y se sometieron a análisis estadístico.

Extracción del tumor

Pasado el periodo del tratamiento se procedió a sacrificar a los ratones, mediante la dislocación cervical, se extirparon los tumores, una parte de los tumores se colocaran en formaldehído 10% para realizar inmunohistoquímicas y otra parte se preservara en congelación a -80°C para realizar extracción de ARN y posteriormente RT-PCR, dichas muestras podrán ser usadas para trabajos posteriores.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y prueba t-student, con ayuda del programa SPSS Statistics ver. 18.0 y Prism Graphpad. La sobrevivencia se evaluó usando la prueba log-rank. $p < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

Se obtuvieron los extractos tanto acuoso como metanólico, provenientes de la planta *Cuphea aequipetala*, conocida como hierba del cáncer y se retaron contra cinco líneas celulares diferentes. El rendimiento del extracto acuoso fue de 80% y del metanólico de 68%.

Determinación del efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala* en las líneas celulares B16F10, MCF7, HEPG2, INER51 y HEK293.

Los porcentajes de viabilidad en las 5 líneas celulares, tratadas con dosis creciente del extracto acuoso se muestra en la figura 10, las líneas celulares MCF7 y HEK293 fueron las más susceptibles al tener tan solo un 14.04% y 17.64% de viabilidad respectivamente a una concentración de 0.2mg/mL, las siguientes fueron INER51 y HEPG2 que a la concentración de 0.4mg/mL tuvieron un porcentaje de viabilidad de 9.46 y 4.40% respectivamente, mientras que la línea B16F10 necesitó una concentración de 0.8mg/mL para presentar una viabilidad de 16.01%.

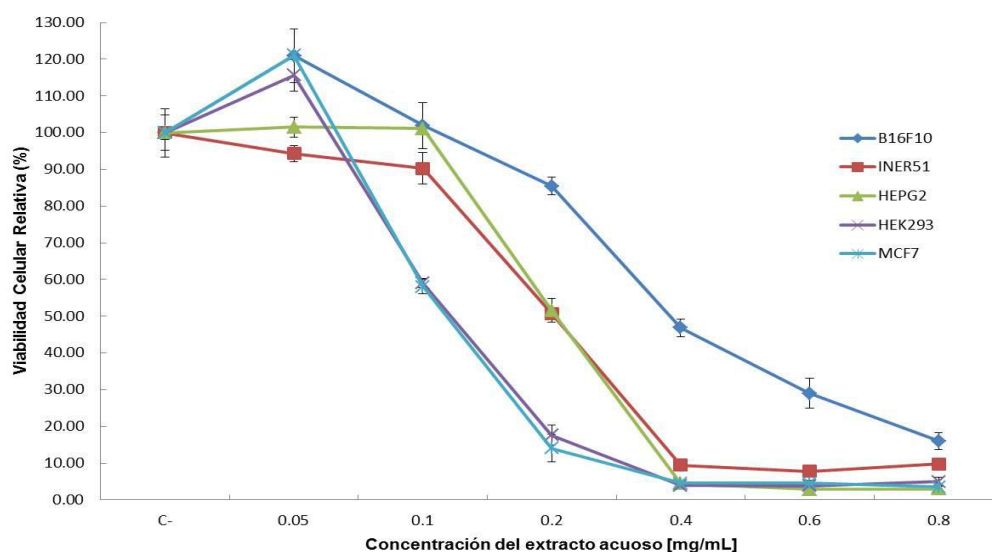


Fig 10. Gráfica del Porcentaje de viabilidad celular en las líneas de cáncer B16F10, INER51, HEPG2, HEK293 y MCF7 expuestas al extracto acuoso de *C. aequipetala* a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL.

La figura 11, muestra el efecto citotóxico del extracto metanólico, el cual tiene un efecto mayor que el preparado acuoso. MCF7, HEK293 y HEPG2, tienen una viabilidad de 9.67, 9.80 y 10.03 % a la concentración de 0.17mg/mL, respectivamente. La línea INER51 alcanza porcentajes de viabilidad similares (7.02%) a los mencionados a la concentración de 0.34mg/mL y B16F10 resulta ser la menos susceptible al necesitar la concentración de 0.68mg/mL para tener una viabilidad de 8.34%. (Ver anexos tabla 8 y 9 para conocer los porcentajes exactos).

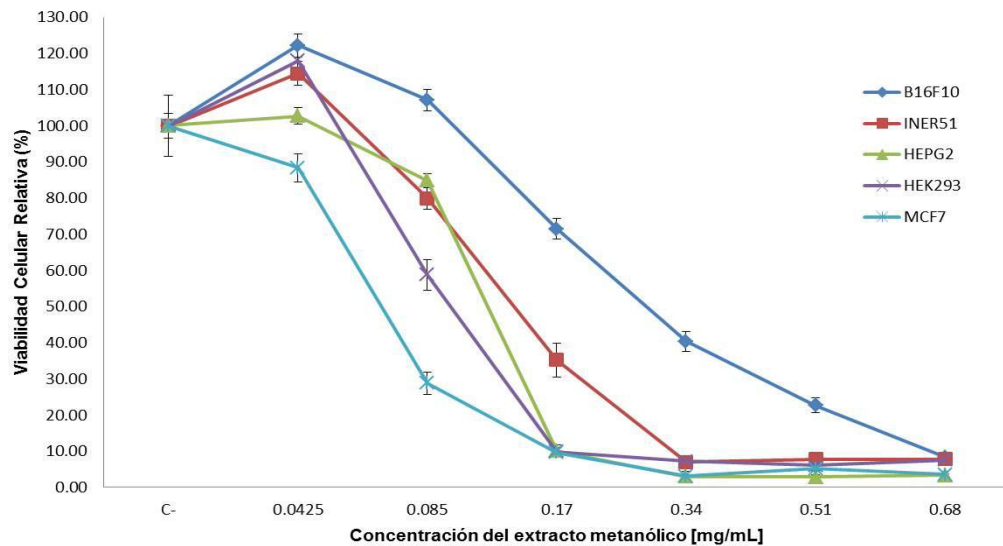


Fig. 11. Gráfica del Porcentaje de viabilidad celular en las líneas de cáncer B16F10, INER51, HEPG2, HEK293 y MCF7 expuestas al extracto metanólico de *C. aequipetala* a concentraciones de 0.042, 0.085, 0.17, 0.34, 0.51 y 0.68 mg/mL.

Se lograron apreciar los efectos citopáticos ocasionados por los extractos sobre las células tratadas con la ayuda del microscopio de luz visible con el objetivo 10X, los cuales se muestran en las figuras 12 y 13 para el extracto acuoso y metanólico respectivamente. En las imágenes se logra apreciar los cambios morfológicos de cada línea celular, así como su encogimiento, a concentraciones mayores se observa solo el núcleo y restos celulares. Para la línea B16F10 sus cambios se observan desde la concentración de 0.40 mg/mL del extracto acuoso y a 0.34 mg/mL del metanólico, para MCF7 los daños se hacen aparentes a 0.10 mg/mL en el acuoso y 0.085 mg/mL en el metanólico, a concentraciones de 0.20 mg/mL del extracto acuoso y 0.085 mg/mL del extracto metanólico tanto en INER51 y HEPG2 se ven los cambios morfológicos, por

último en la línea transformada HEK293 se aprecia el daño en la membrana celular a concentraciones de 0.10mg/mL y 0.085mg/mL de los extractos acuoso y metanólico.

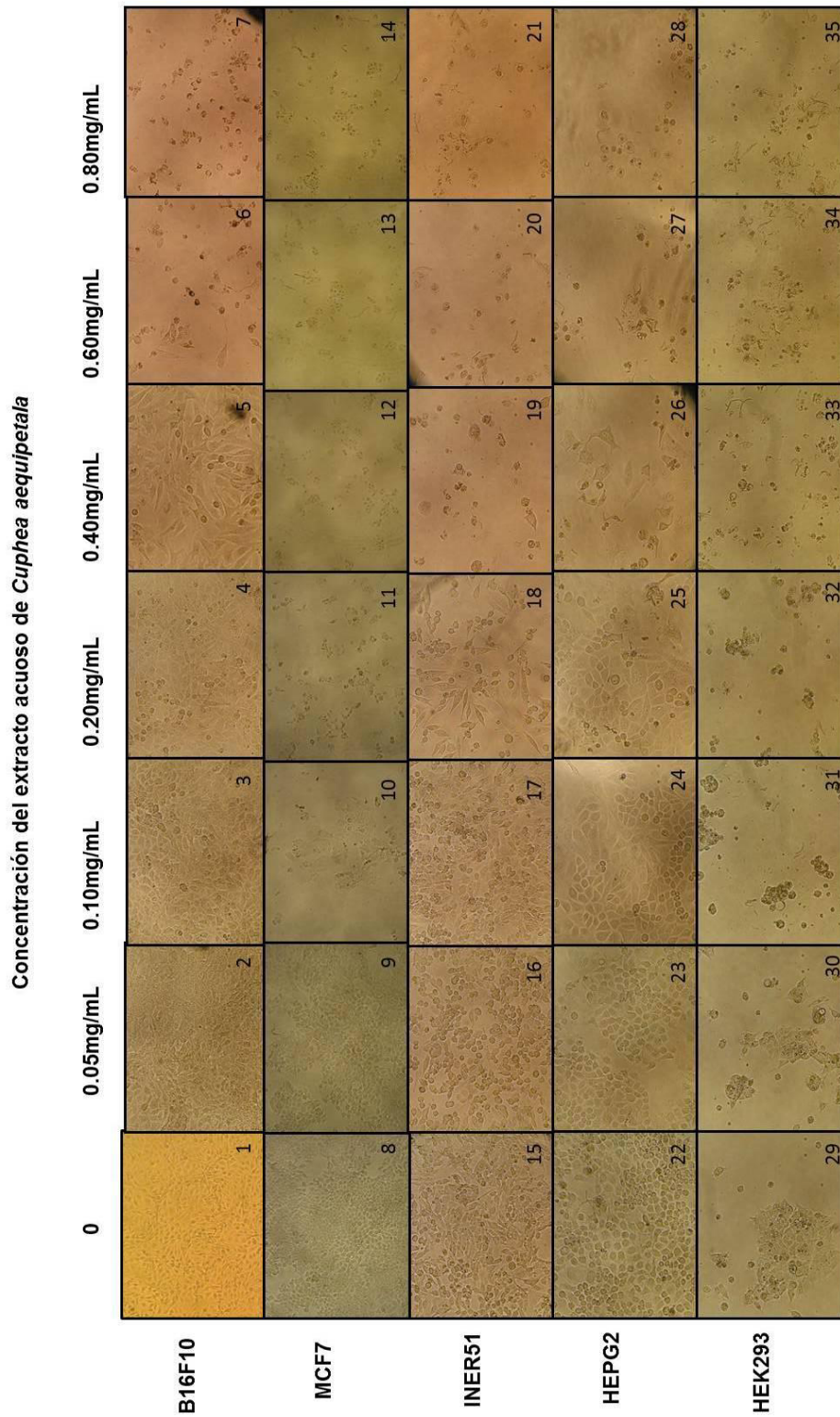


Fig. 12. Efecto citotóxico producido por el extracto acuoso de *C. aequipetala* a las 72h de tratamiento, en las líneas celulares B16F10(1-7), MCF7 (8-14), INER51 (15-21), HEPG2 (22-28) y HEK293 (29-35). Visto en el objetivo 10X del microscopio invertido

Concentración del extracto metanólico de *Cuphea aequipetala*

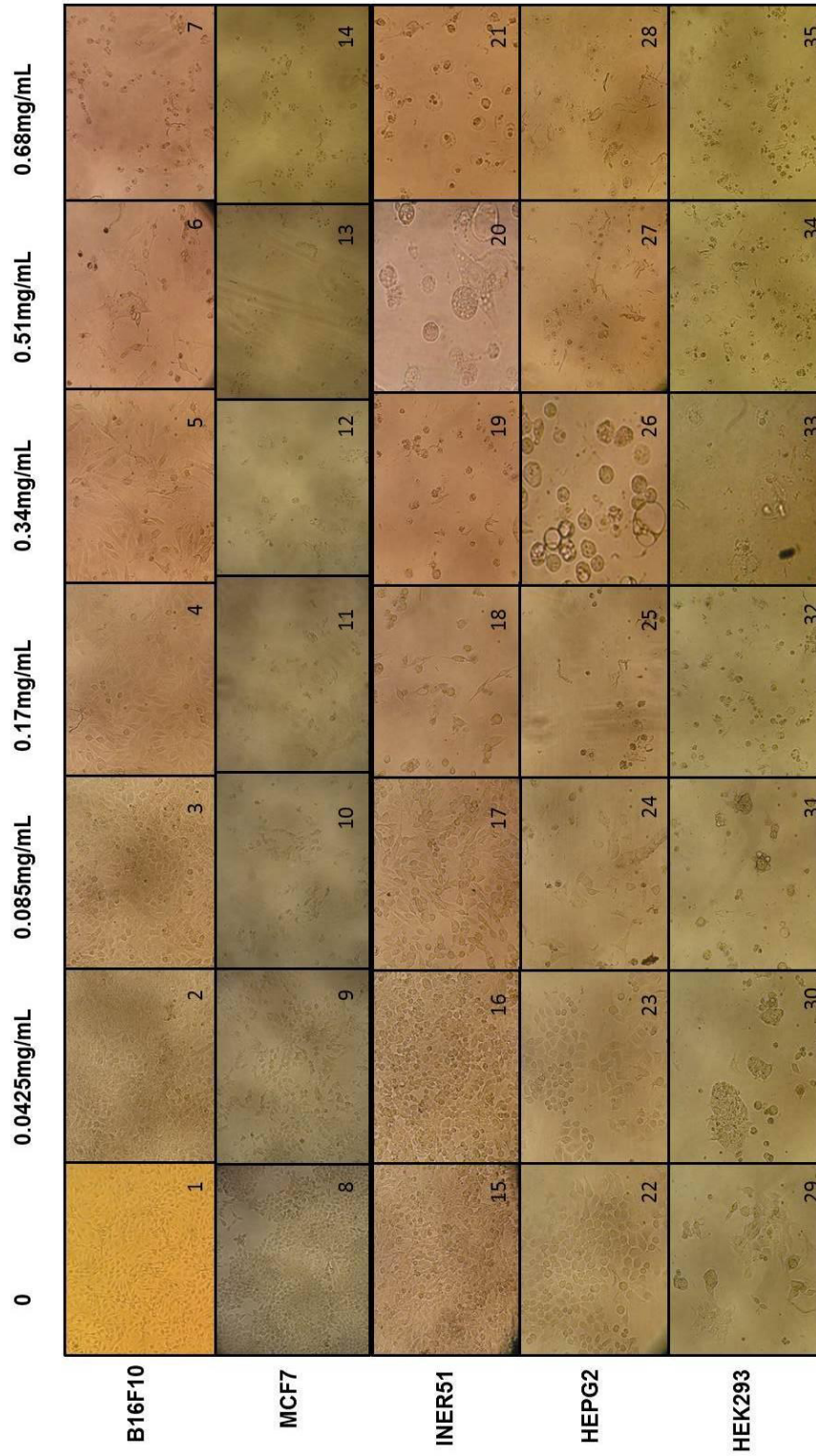


Fig. 13. Efecto citotóxico producido por el extracto metanólico de *C. aequipetala* a las 72h de tratamiento, en las líneas celulares B16F10 (1-7), MCF7 (8-14), INER51 (15-21), HEPG2 (22-28) y HEK293 (29-35). Visto en el objetivo 10X del microscopio invertido

Empleando la ecuación de la pendiente de las gráficas se obtuvieron las Concentraciones Citotóxicas Medias, tal como se explicó en la metodología, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10. Concentraciones Citotóxicas Medias del extracto acuoso y metanólico en las diferentes líneas celulares empleadas.

		B16F10	MCF7	INER51	HEPG2	HEK293
Extractos de <i>C. aequipetala</i> en µg/mL	Acuoso	364.33	173.54	205.02	212.52	168.81
	Metanólico	269.71	96.45	169.24	145.88	146.62

En el modelo que implementamos *in vivo* se utilizó la línea celular de melanoma murino (B16F10) los experimentos posteriores se realizaron sobre esta línea y empleando solo el extracto metanólico ya que fue el que presentó un efecto mayor.

Determinación de la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica.

Para probar si los extractos afectan a células humanas no neoplásicas, se obtuvieron CMSP, poniéndolas a prueba en contra de los extractos, se encontró que la citotoxicidad presentada frente a dichas células es muy baja o inexistente, ya que el ensayo de viabilidad celular (MTT) no muestra diferencia entre el control sin tratamiento y las diferentes concentraciones empleadas (Fig. 14).

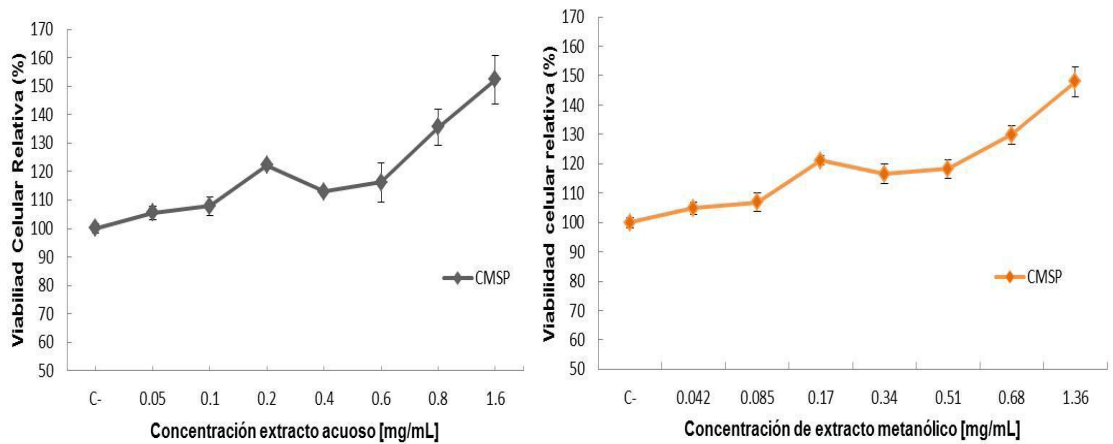


Fig. 14. Gráficas del porcentaje de viabilidad en las células mononucleares de sangre periférica, tratadas con el extracto acuoso (grafica de la izquierda) y el extracto metanólico (grafica derecha) a diferentes concentraciones.

Ensayo de formación de colonias o clonogénico

Este es un ensayo de sobrevivencia basado en la habilidad de una sola célula de formar una colonia, se considera colonia cuando está formada al menos de 50 células hijas. Es el método de elección para determinar la muerte celular reproductiva después del tratamiento con radiaciones ionizantes, pero también se puede utilizar para determinar la eficacia de otros agentes citotóxicos. En este caso usamos como agente citotóxico el extracto metanólico de *C. aequipetala* el cual fue adicionado a un número conocido de células (50 y 100 para los controles y 500 para las tratadas) y solo se dejó en contacto célula-extracto por 24h, las concentraciones empleadas fueron de 0.085, 0.17, 0.34, 0.68mg/mL, obteniendo un promedio de 162, 132, 138 y 4 colonias respectivamente.

La figura 15 muestra un ejemplo representativo de las colonias formadas a las diferentes concentraciones utilizadas.

Empleando la formula descrita en la metodología se obtuvo una eficiencia de plaqueo (EP) de 72.25% y las fracciones sobrevivientes (FS) resultaron en 32.2% a la concentración de 0.085mg/mL, de 26.4%, 24.6% y 0.8% a las concentraciones de 0.17mg/mL, 0.34mg/mL y 0.68mg/mL respectivamente. Los datos se resumen en la figura 16.

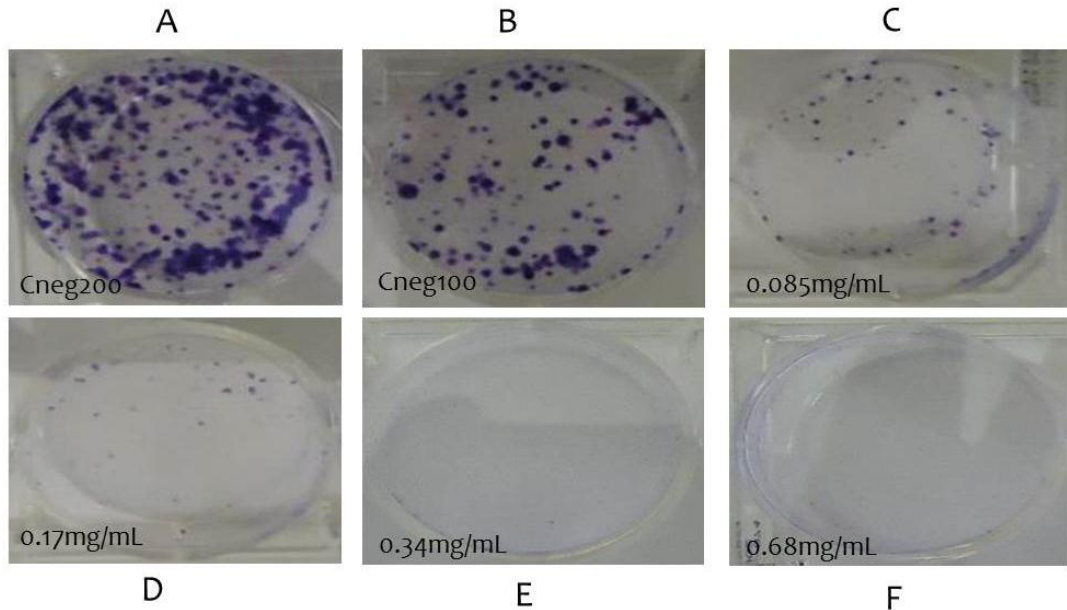


Fig. 15. Ensayo de formación de colonias. A y B: Control con 200 y 100 células B16F10 sin tratamiento, C, D, E y F; 500 células tratadas a las concentraciones de 0.085, 0.17, 0.34, 0.68mg/mL respectivamente.

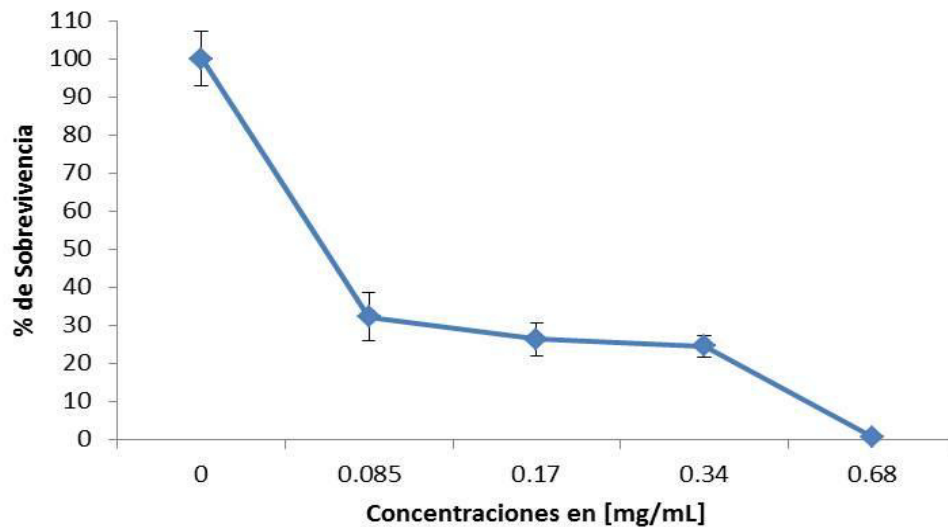


Fig. 16. Gráfica de porcentaje de sobrevivencia de las células B16F10, tratadas con el extracto metanólico de *C. aequipetala*, donde se aprecia que al aumentar la concentración, la sobrevivencia celular decrece.

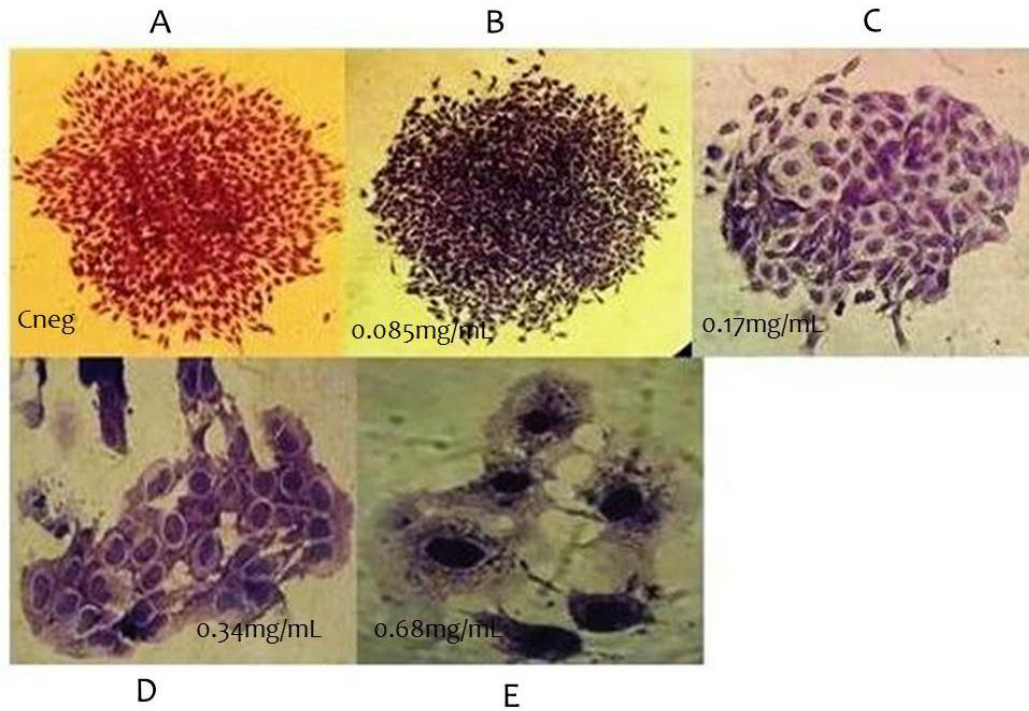


Fig. 17. Morfología de las colonias observadas en el ensayo clonogénico. A: Control con 100 células B16F10 sin tratamiento, B, C, D y E; 500 células tratadas a las concentraciones de 0.085, 0.17, 0.34, 0.68mg/mL respectivamente. A y B vistas con aumento de 10X, C con 20X, D y E 40X.

Ciclo celular y SubG1

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo nos permite no solo representar en histogramas las tres principales fases del ciclo celular (G1, S y G2/M), sino además hace posible la detección de células apoptóticas con contenido de ADN fraccionado, esto en base al análisis univariado del contenido de ADN celular, después de la tinción con yoduro de propidio o 4', 6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). En nuestro caso empleamos el Yoduro de propidio (PI) para teñir el ácido nucleico y se interpretó mediante el software del FACS Accury de BD. La fig. 18 nos ilustra los histogramas, donde se designó de negro el control negativo (Sin Tratamiento), de azul el control positivo (etoposido a 150 μ M) y la línea roja es el tratamiento con extracto metanólico, el inciso 1 a, b) son las células analizadas a las 24h, 2 a, b) a las 48h y 3 a, b) a las 72h, en el control negativo, se comporta como esperaba, con un pico en G0/G1, después la meseta S y otro pico

menor que representa las fases G2/M, mientras que en el tratado con el extracto de *C. aequipetala*, se observan dos picos muy juntos, el pico que esta próximo al eje de las ordenadas es la fase SubG1, fase en la que se considera que las células están en apoptosis ya que su material genético está fragmentado, conforme pasa el tiempo de exposición al tratamiento (48h y 72h) este pico va aumentando , en el control positivo desde las 24h se observa como el pico de G0/G1 esta disminuido y corrido hacia la derecha, mostrando la fase SubG1 lejos del pico G0/G1.

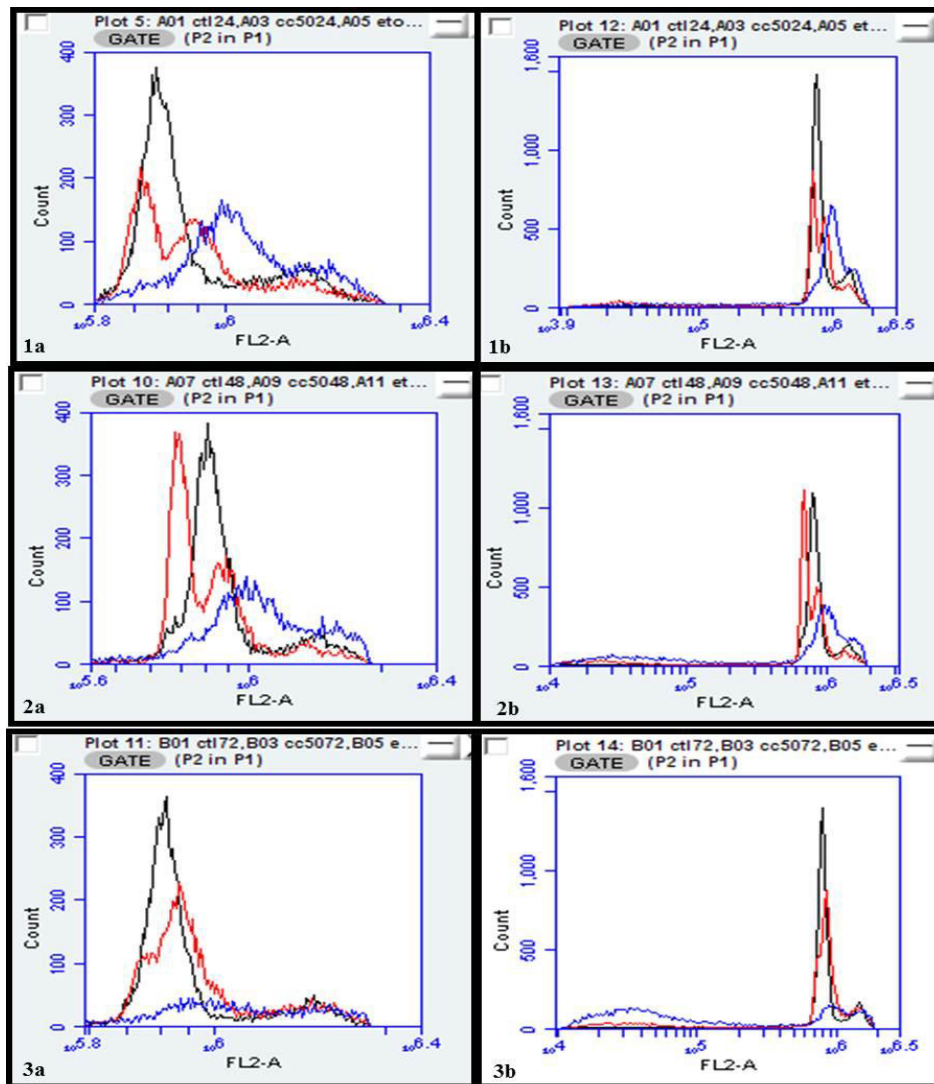


Fig. 18. Histogramas del ciclo celular. 1a y b. Ciclo celular pasadas las 24h con los respectivos tratamientos. Negro (C-), Rojo (Trat metanolico), Azul (C+). 2 a y b. células despues de 48h y 3 a y b. células despues de 72h con los tratamientos

En la siguiente grafica se resume el porcentaje de distribución celular de los diferentes tratamientos a través de los diferentes tiempos. La fase SubG1 fue aumentando conforme las células estaban más tiempo expuestas tanto al tratamiento con el extracto metanólico como el control positivo, los que nos sugiere la muerte por apoptosis.

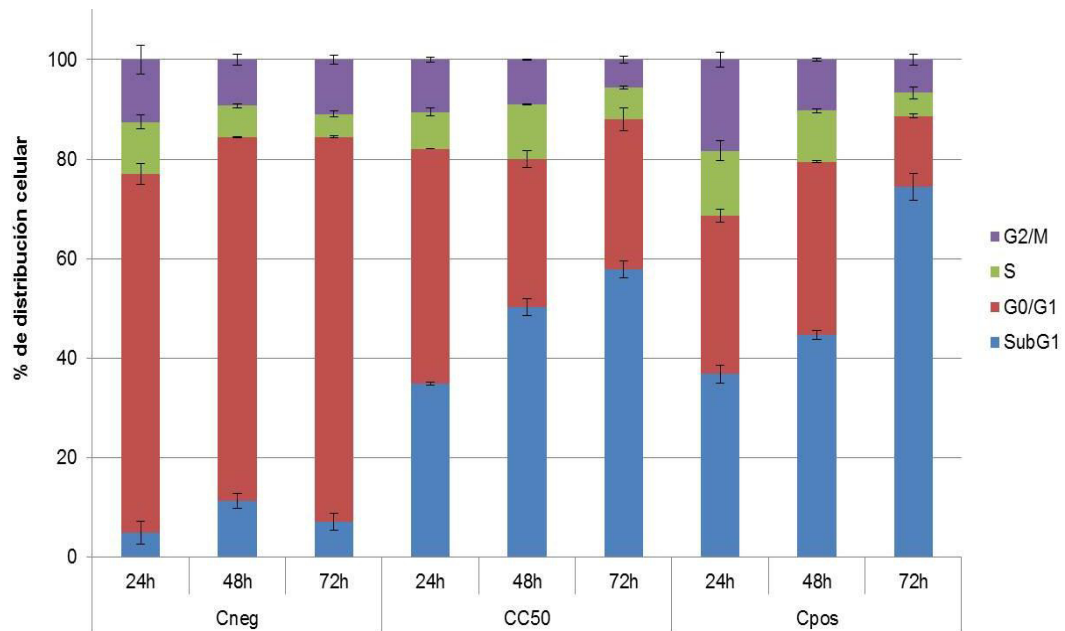


Fig. 19. Porcentaje de la distribución de las fases del ciclo celular, en las células de melanoma murino, sin tratamiento (Cneg), tratadas con extracto metanolico de la hierba del cáncer (CC50) y tratadas con etoposido 150µM (Cpos) a diferentes horas (24, 48 y 72h).

Cinética e Inhibición de caspasas

Para conocer el porcentaje de células que entraban en apoptosis, se empleó la citometría de flujo, se tiñeron las células de B16F10 con Anexina-APC y PI. Las células fueron tratadas con el extracto metanólico a concentraciones de 0.135mg/mL (la mitad de la CC50), 0.270mg/mL (CC50) y 2mg/mL, un control negativo sin tratamiento y un control positivo el etopósido a 150µM, además se expusieron durante diferentes periodos, 24, 48 y 72h, esto para confirmar lo que el ensayo de citotoxicidad nos demostró, de a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, mayor muerte celular. La grafica 20 nos muestra la cinética de muerte de las células B16F10 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos d exposición, en el control se observa

muerte del 5% a las 24 y 48h mientras que a las 72h aumenta a 12%, esto se explica porque se van acabando los nutrientes del medio, ya que este no se cambia durante el experimento, con la concentración de 0.135mg/mL la muerte a las 24h es de 19% y a las 48 y 72h llega a los 35%, la concentración citotóxica media a las 24h nos dio un porcentaje de anexina positivo del 52%, mientras que a las 48h este porcentaje solo llego a 58%, a las 72h alcanzo un porcentaje de anexina positivo de 98%.

A la concentración más alta empleada de 2mg/mL la muerte fue muy similar en los tres periodos de tiempo, teniendo alrededor del 98% de anexina positivo. El control positivo, se comportó de una forma esperada ya que fue causando muerte de manera progresiva a las células, comenzando con un 19% a las 24h, seguido de un 47% a las 48h y al final un 87% a las 72h.

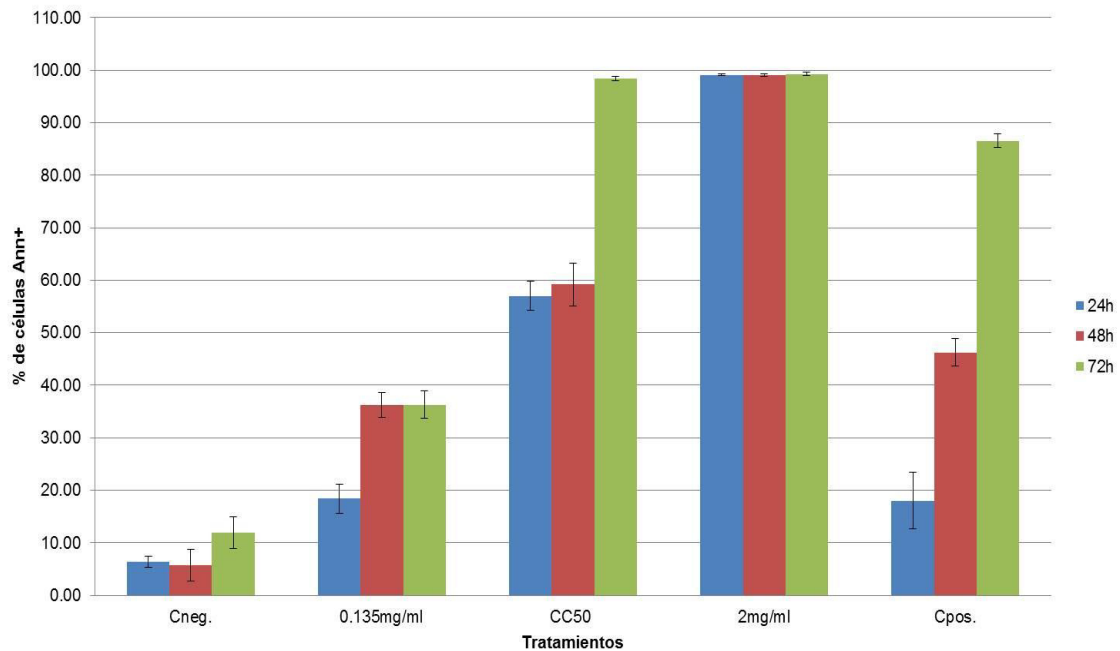


Fig. 20. Cinética de muerte de la línea celular B16F10 tratada a diferentes concentraciones y períodos de tiempo.

Las figuras 21, 22, 23, 24 y 25 muestran los histogramas representativos de cada tratamiento a lo largo del tiempo y con las diferentes concentraciones, las cuales sirvieron para hacer la gráfica de cinética de muerte.

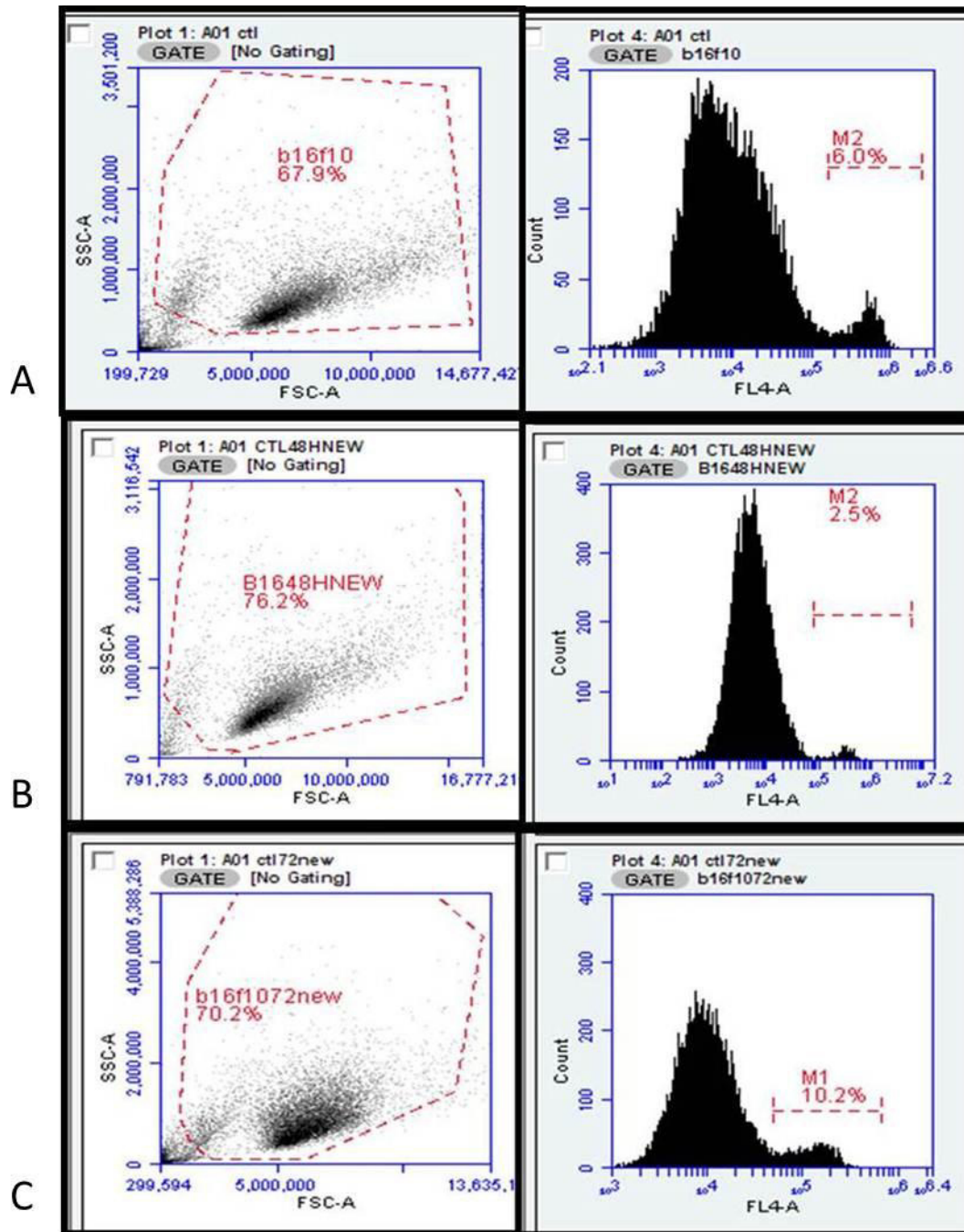


Fig. 21. Cinética de muerte del control negativo, células B16F10 sin tratamiento, que fueron teñidas con Anexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están vivas, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Anexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

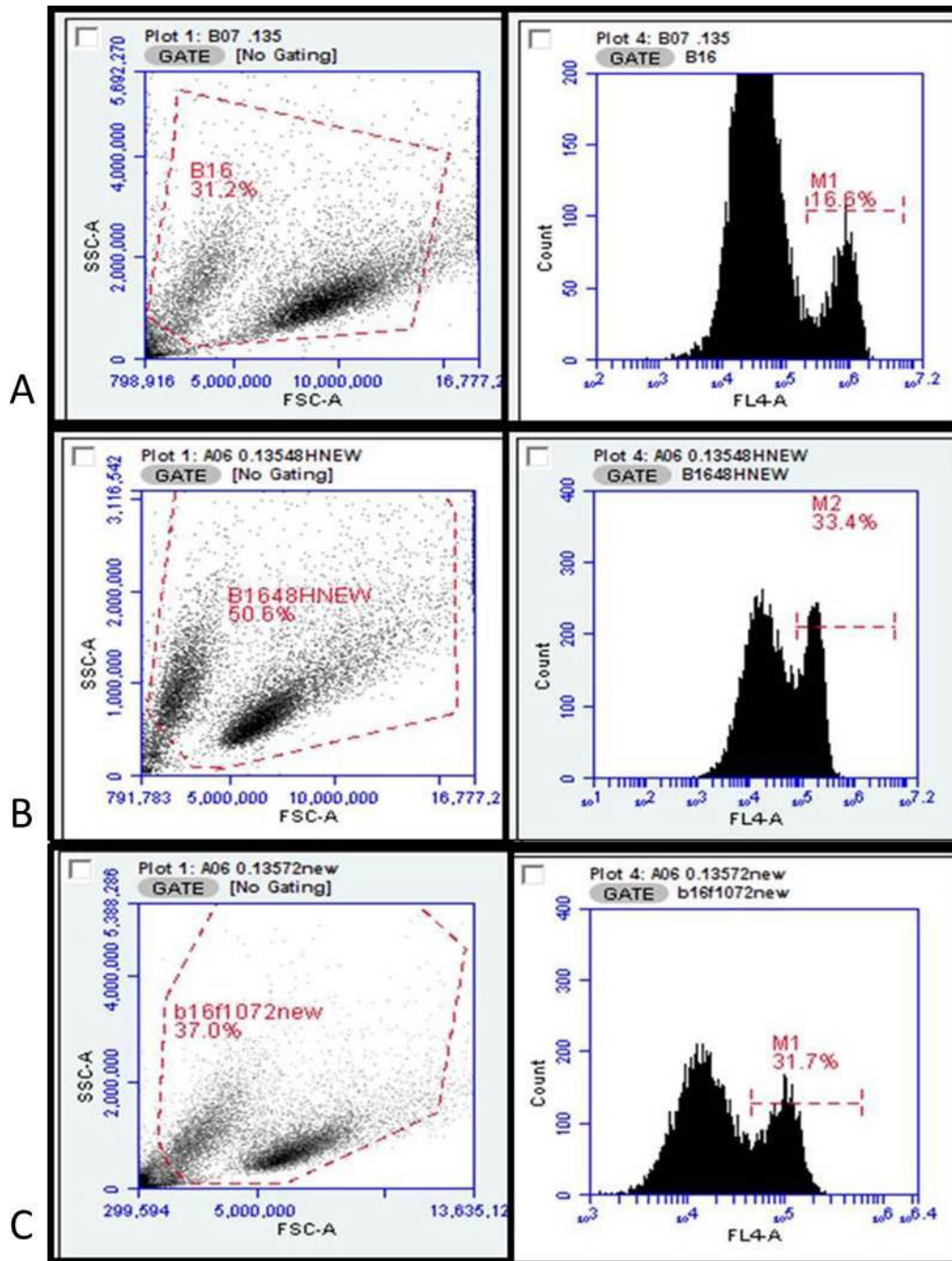


Fig. 22. Cinética de muerte en células B16F10 tratadas con 0.135mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Anexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están vivas, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Anexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

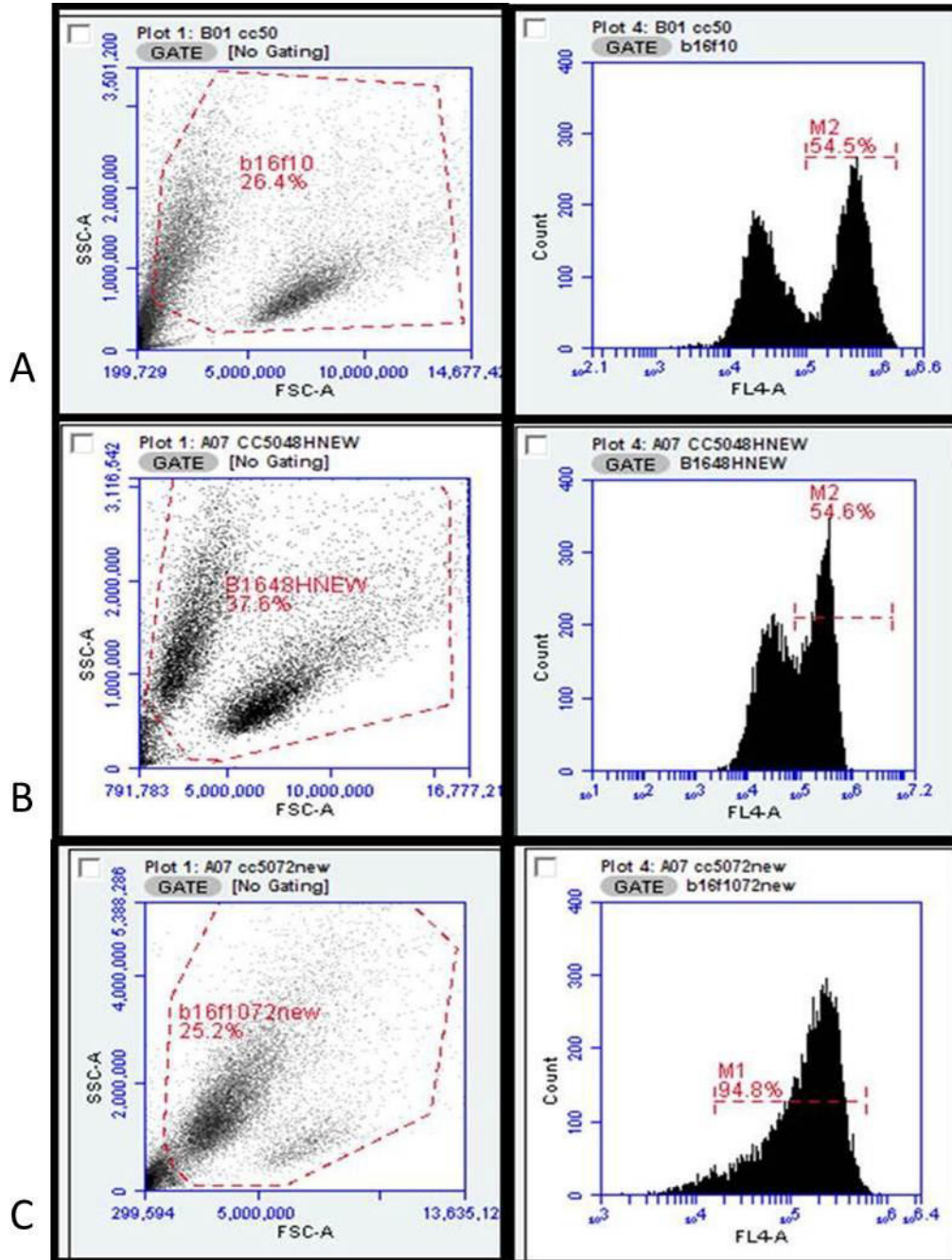


Fig. 23. Cinética de muerte. Células B16F10 tratadas con 0.270mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Anexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Anexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

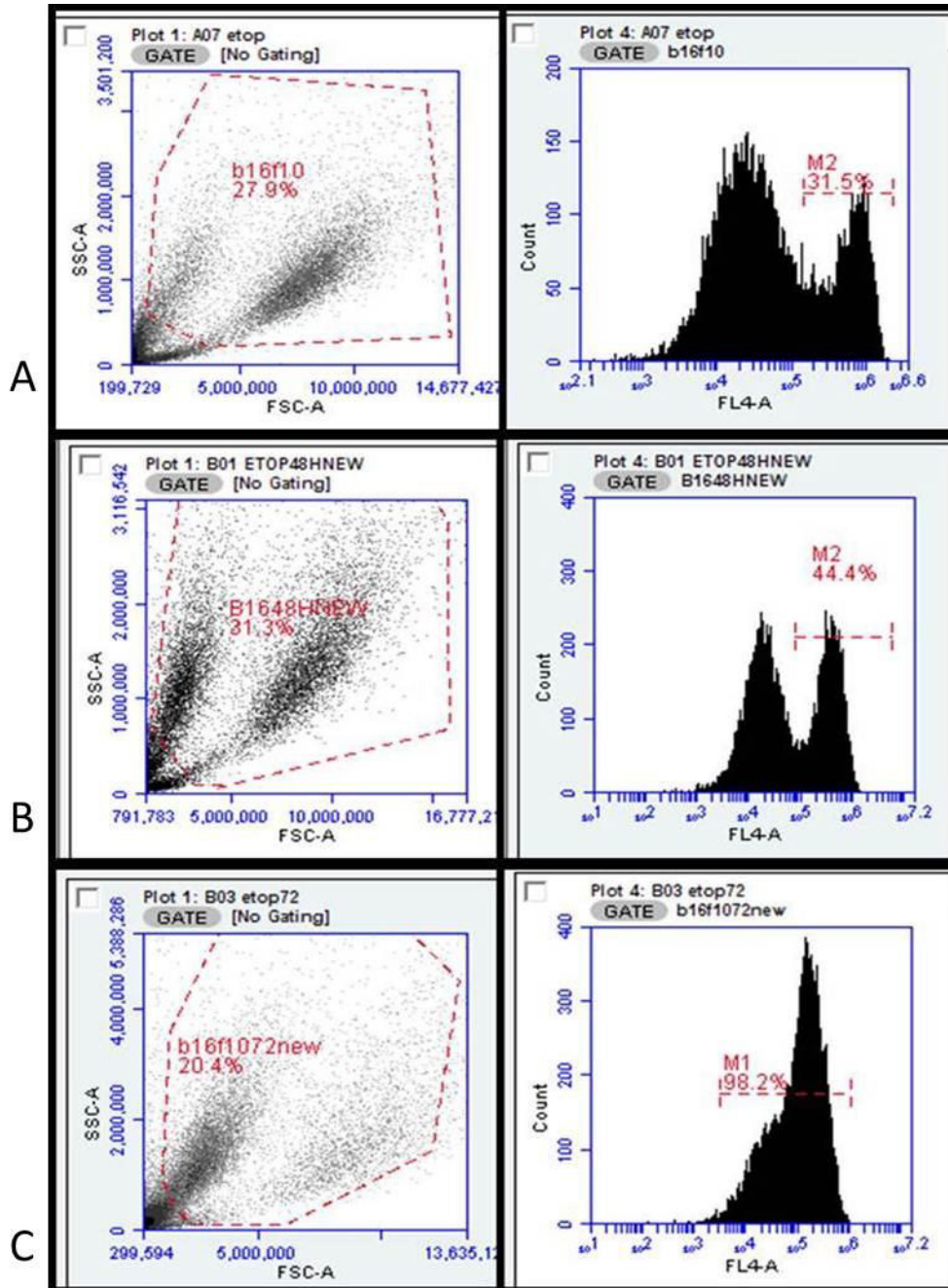


Fig. 24. Cinética de muerte. Células B16F10 tratadas con 150 μ M del etoposido, usado como control positivo, teñidas con Anexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Anexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

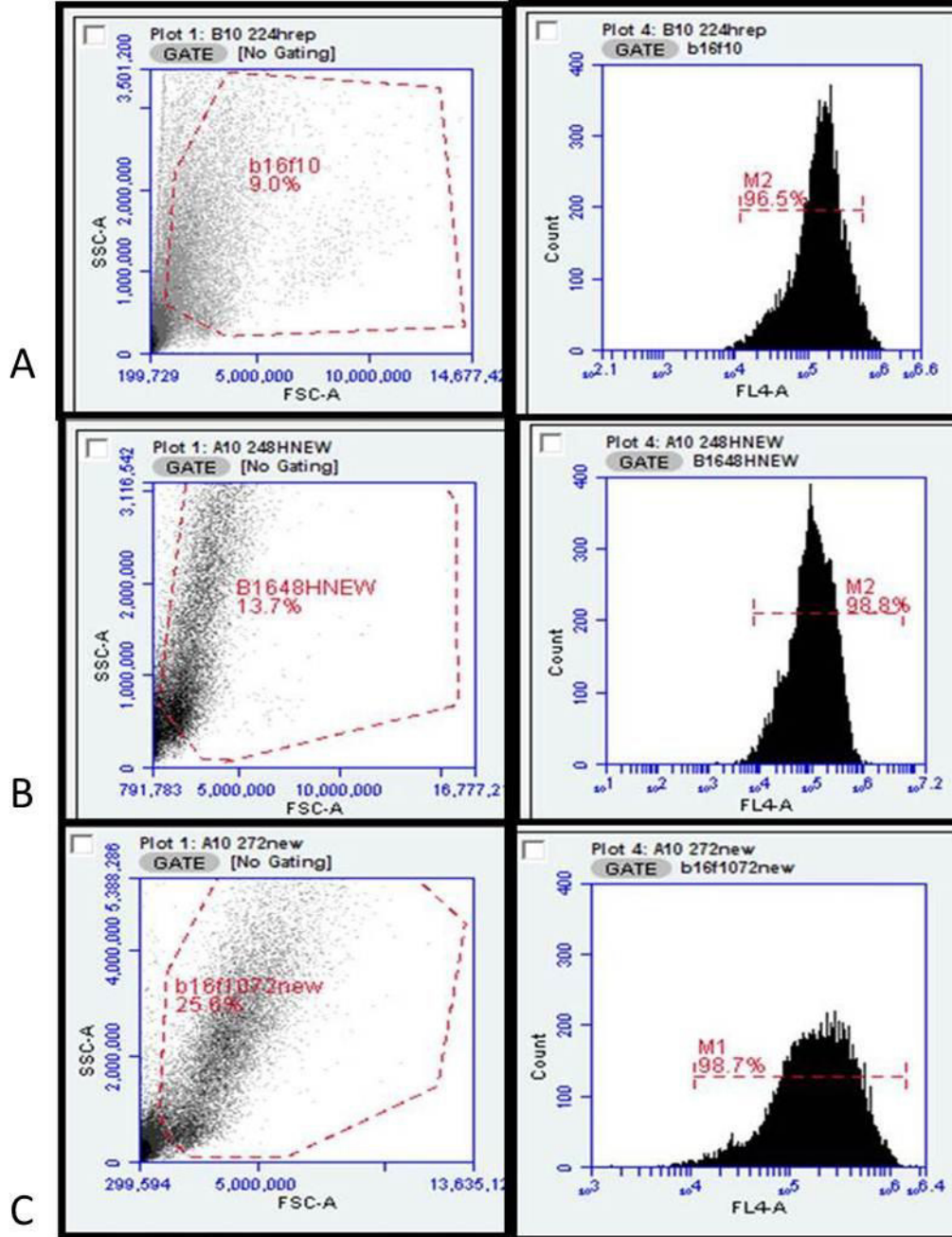


Fig. 25. Cinética de muerte. Celulas B16F10 tratadas con 2mg/mL del extracto metanólico de *C. aequipetala*, que fueron teñidas con Anexina-PI. A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, lo que indica que estas células están muertas debido a la falta de tamaño y exceso de granularidad, del lado derecho se muestra el histograma de la tinción de Anexina+ y las líneas punteadas indican el porcentaje de células con Ann. A=24h, B= 48h, C=72h.

De igual manera se realizó la inhibición de caspasas en células de la línea de melanoma murino empleando el inhibidor Q-VD-OPh a una concentración de 10 μ M, solo se realizó a las 24h de expuestas las células a los tratamientos, de nuevo un control negativo sin tratamiento y uno positivo además del extracto en cuestión. La siguiente gráfica nos muestra como en el control negativo no hay una citotóxicidad significativa por parte del inhibidor, además de que no hay un cambio en el porcentaje de las células teñidas con Anexina, en la células con el extracto metanólico no hubo una diferencia significativa entre las células con inhibidor y sin inhibidor, mientras en el control positivo existe una diferencia significativa entre las células con y sin Q-VD-OPh, indicando que apoptosis generada por el etoposido es dependiente de caspasas para la línea celular B16F10. Los datos fueron analizados con el paquete Graphpad.

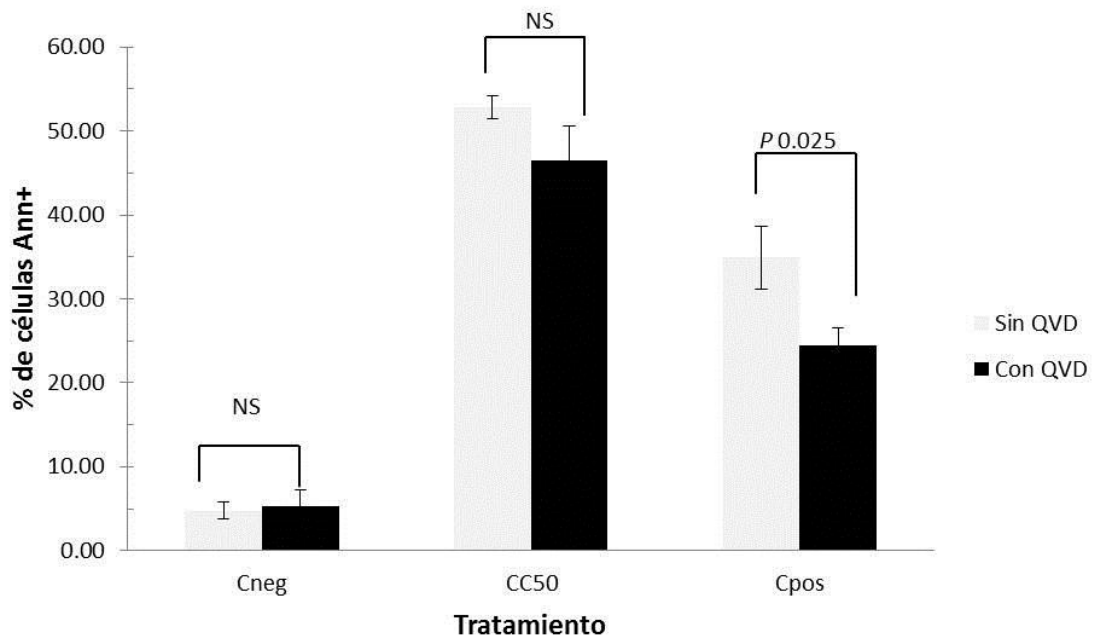


Fig. 26. Porcentaje de células anexina positivas en los diferentes tratamientos, con y sin inhibidor de caspasa (Q-VD-OPh).

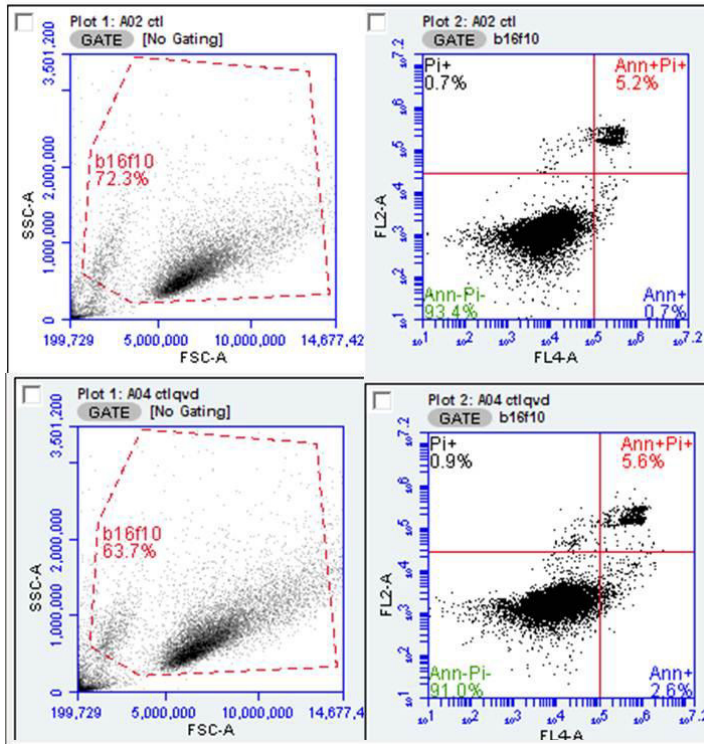


Fig. 27. Plots de células B16F10 (Cneg) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas A la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FL4-A), cuadrante inferior izquierdo es doble negativo, derecho inferior Ann+, superior derecho doble positivo y cuadrante superior izquierdo PI+.

Fig. 28. Plots de células B16F10 (CC₅₀) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas, a la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FL4-A), donde se observa que sin inhibidor el doble positivo es de 46.7% y con inhibidor disminuye a 39.5%, pero el simple positivo para PI aumenta con el Q-VD-Oph.

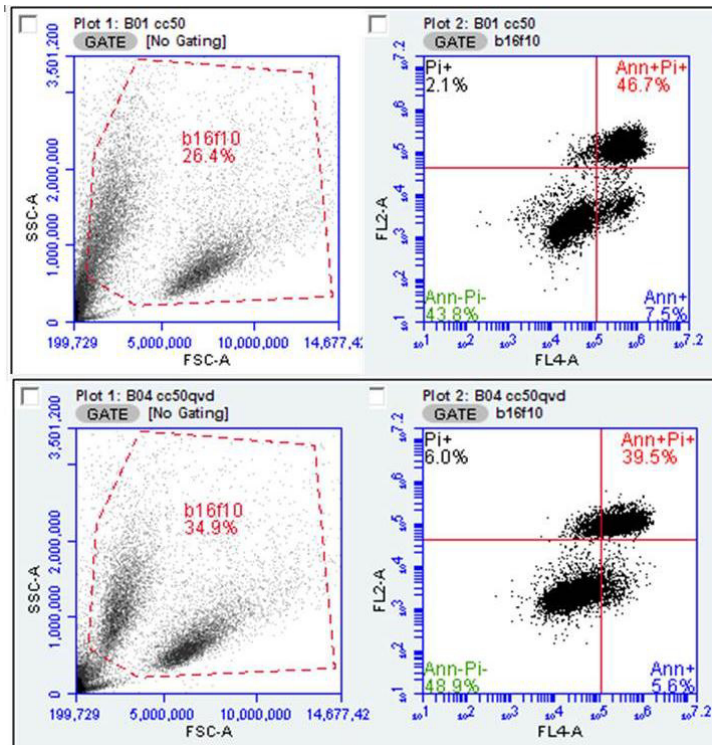
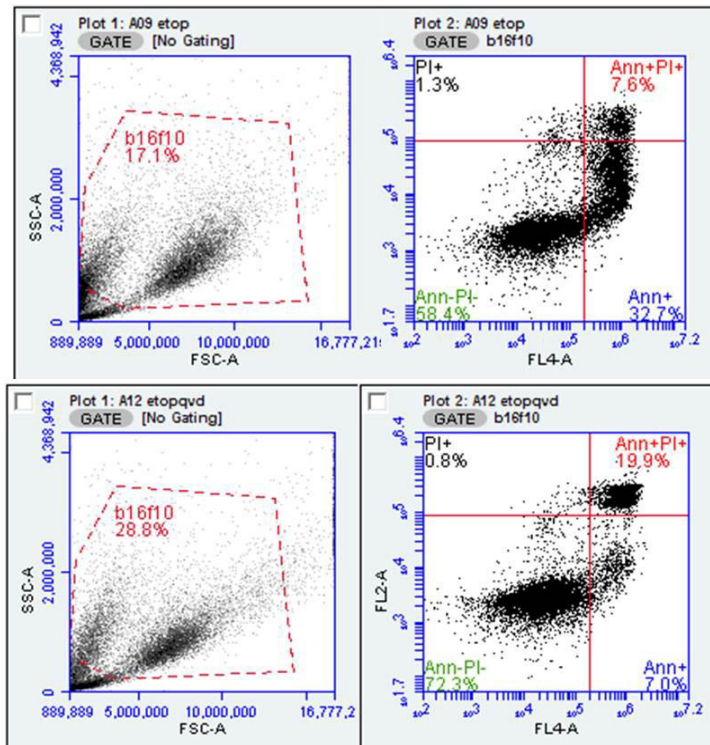


Fig. 29. Plots de células B16F10 (Cpost.) sin inhibidor y con el inhibidor de caspasas, a la izquierda se muestran la granularidad y el tamaño celular, a la derecha se muestra el dot plot de la doble tinción con PI (FL2-A) y Ann (FLA-A). Se observa en la parte superior derecha como la Ann+ es de 32.7% sin inhibidor y al exponer al inhibidor se disminuye a 7.0%, sin embargo aumenta el doble positivo de 7.6% sin inhibidor a 19.9% con el Q-VD-OPh.



Observación de la condensación nuclear por medio de tinción con Hoechst

La tinción con Hoechst 33258, mostró que ocurrieron cambios morfológicos significativos en la cromatina nuclear de las células tratadas con el extracto metanólico de *C. aequipetala*. En el grupo no tratado, los núcleos se tiñeron de un azul menos brillante, lo que indica menos condensación nuclear mientras que en las células tratadas con la CC50 del extracto (0.270 mg/ mL) durante 24, 48 y 72 horas, el azul emitido fue más intenso, lo que nos da una idea de que estas células están muriendo, también se metió el etopósido como control positivo de muerte por apoptosis, pero en esta línea de melanoma murino, no se aprecia un encogimiento del núcleo, pro si se aprecia un azul más brillante que en el control negativo.

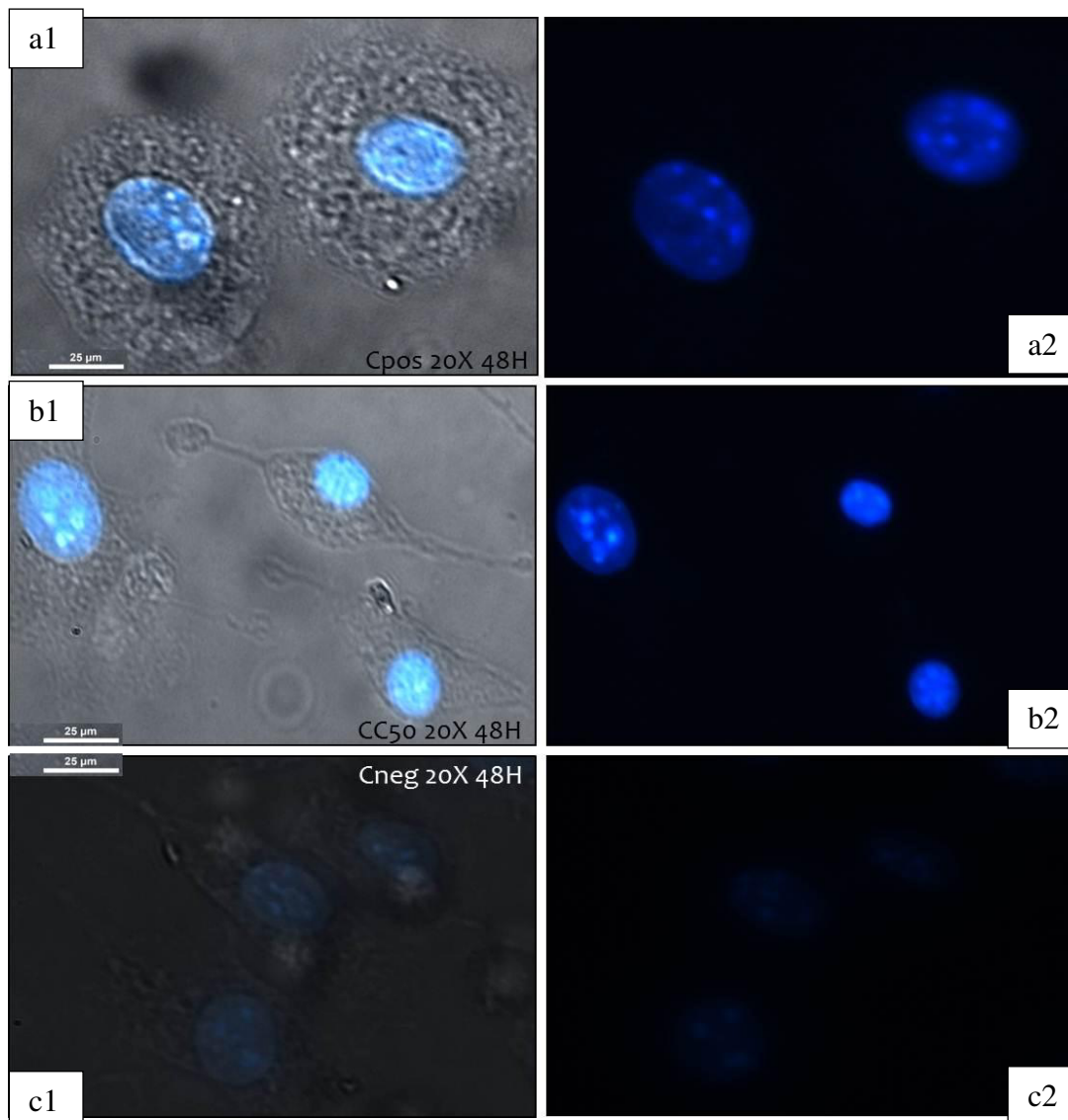


Fig. 30. Tinción nuclear con Hoechst 33258. Micrografía fluorescente de las células B16F10 después de 48h tratadas con a1, 2. Control positivo, tratamiento con Etopósido (150µM), b1, 2. 0.270mg/mL del extracto metanólicas y c1, 2 Control negativo sin tratamiento. Las figuras a,b y c 1 son imágenes compuestas la luz visible traslapada con la luz fluorescente, las imágenes a,b y c 2. Son solo las fluorescentes.

Con ayuda del programa ImagenJ, se realizaron mediciones de área a los núcleos de las células, tratadas y sin tratar, los resultados se resumen en la grafica siguiente, donde se demuestra estadísticamente que existe diferencia significativa entre los tamaños del núcleo de las células tratadas respecto al control sin tratamiento.

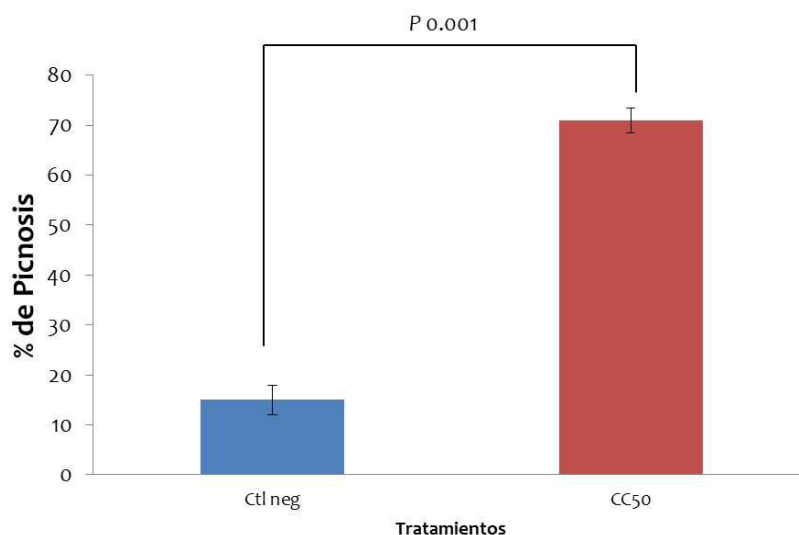


Fig. 31. Gráfica del porcentaje de picnosis en células B16F10 sin tratamiento y tratadas con el extracto metanólico de *C. aequipetala* a una concentración de 270µg/mL (CC50), $p = 0.001$

Fragmentación del ADN

El ensayo de fragmentación del ADN se empleó para conocer la integridad del ADN y darnos una idea del tipo de muerte generada por el extracto metanólico de *C. aequipetala* en las líneas B16F10. Se conoce que la muerte por apoptosis fragmenta el ADN generando bandas de aproximadamente 150pb, que al correrlas en un gel de agarosa se aprecia un patrón escalonado, en este caso corrimos un control positivo que consistió en células B16F10 tratadas con el quimioterapéutico Doxorubicina, el cual presento el patrón de escalonamiento aunque esta enmascarado por el barrido de la degradación del ADN, comparando este resultado con el del tratado con los extractos, se aprecia que es similar al control positivo, mientras que el control negativo que consiste en células B16F10 sin tratamiento no se observa ni el patrón de escalonamiento ni el barrido (Fig. 32) , los ADNs obtenidos se cuantificaron al nanodrop y se ajustaron para cargar 25µg/µL (10µL) en el gel de agarosa a 2% durante 20min a 100volts.

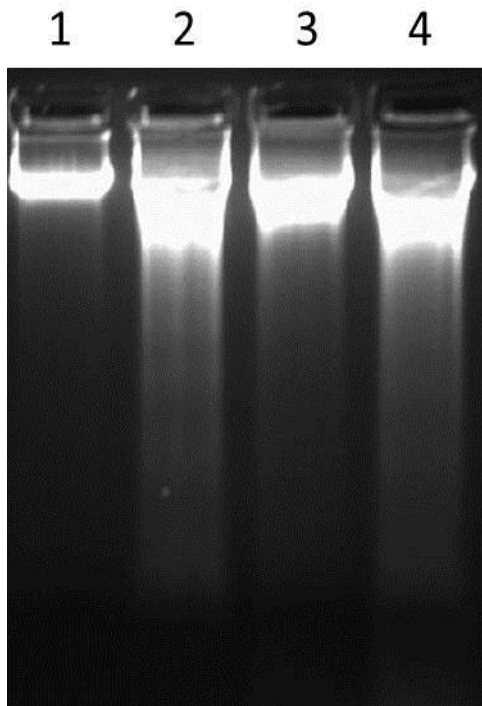


Fig. 32. Fragmentación de ADN. La imagen muestra el gel de agarosa al 2% en el cual se cargaron 10 μ L de las extracciones de ADN de las células B16F10 tratadas con 1. Control Negativo, 2. Control positivo (Doxorrubicina), 3. Extracto metanólico, 4. Extracto acuoso. Se aprecia como un escalonamiento, en los carriles 2,3 y 4 mientras que en el primero no. La estela en forma de escalera que se observa, nos indica que la forma de muerte es por apoptosis.

1= C- Sin Trat.
 2= C+ trat. Doxo
 3= B16F10 trat. Metanólico
 4= B16F10 trat. Acuoso

Expresión de genes anti y pro apoptóticos, de proliferación y angiogénicos

La obtención del ARN mensajero de las células de melanoma murino se llevó a cabo para conocer si existía alguno tipo de modulación en ciertos genes de apoptosis, proliferación y angiogénicos, que dieran paso a conocer más sobre el mecanismo en que el extracto actúa produciendo la muerte de las células neoplásicas en cuestión.

Los genes antiapoptóticos analizados fueron: *bcl-2* y *bcl-x_L*, mientras que el proapoptótico fue *bcl-x_S*, como control de carga se empleó el gen endógeno G3PDH.

La fig. 33 muestra los resultados de los diferentes PCRs, donde se observa gracias al gen constitutivo que la cantidad de producto de PCR fue homogénea, para las 3 líneas celulares tratadas, en B16F10 el gen *bcl-x* solo la isoforma grande (large) la cual es antiapoptótica se vio modulada, primeramente pareció incrementar su expresión y posteriormente fue disminuyendo conforme pasaron las horas a las que las células estuvieron expuestas al extracto, mientras que las líneas malignas humanas MCF7 y HEPG2 presentaron ambas isoformas tanto la grande como la pequeña, es hasta las 48h

donde se observa que la isoforma proapoptótica comienza a expresarse y la isoforma grande tiende a disminuir. Por otro lado el gen *bcl-2* en las líneas humanas no presenta ningún tipo de modulación y en la B16F10 no se logra amplificar el gen. La falta de modulación del gen antiapoptótico *bcl-2* no indica que el extracto no está afectando dicho gen, solo da una idea de que quizá no es la vía de muerte que utiliza, además cabe mencionar que a pesar de no estar disminuido, no se conoce si es funcional, para ellos se realizó además el ensayo de Wester blot, fig. 34 donde se observa que la expresión de la proteína de Bcl-2 disminuye al paso de la exposición con el extracto metanólico y la proteína del gen Bax, un gen proapoptótico, se aprecia conservado, esto en la línea celular B16F10.

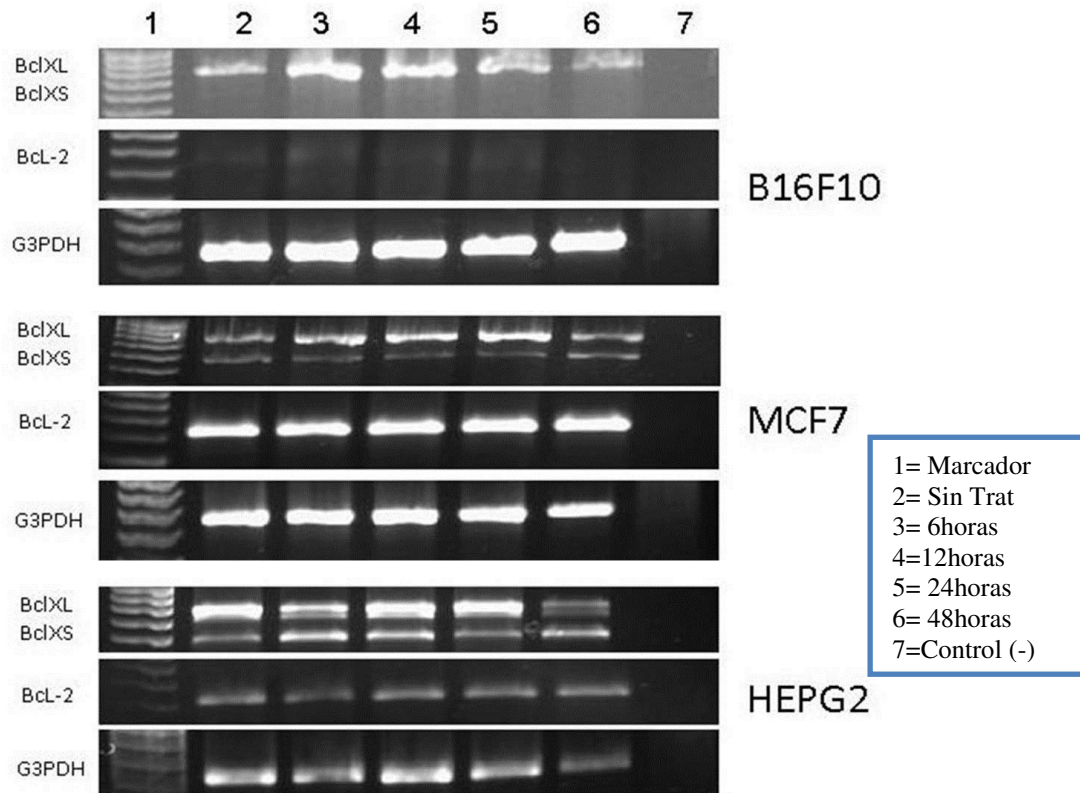


Fig. 33. Gel de agarosa al 1%, con los productos del PCR de los diferentes genes pro y antiapoptóticos, en las líneas celulares B16F10, MCF7 y HEPG2. 1. Marcador de talla molecular. 2. ST, 3. Cél. Expuestas al extracto metanólico a 6h, 4. 12h, 5. 24h, 6. 48 y 7. C- (sin ADN).

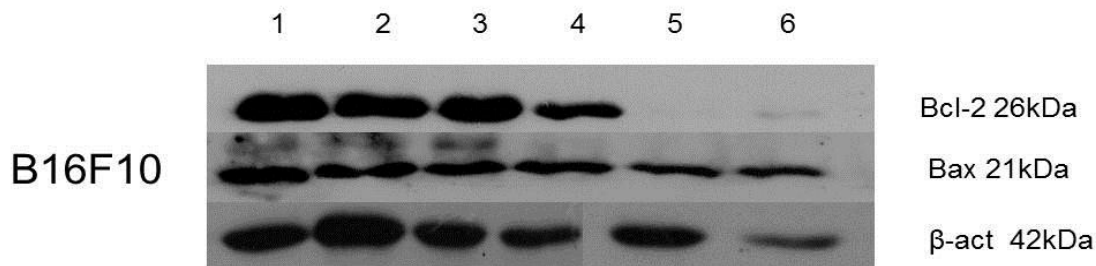


Fig. 34. Expresión d las proteínas de los genes *bcl-2* y *bax*, en B16F10. El carril 1, célula sin tratamiento, 2, 3, 4,5 y 6, diferentes tiempo d exposición al extracto, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h respectivamente. β-actina empleado como gen constitutivo de control de carga.

Continuando con la amplificación de los genes, en la fig. 35 se muestran los geles al 1% de agarosa con los productos de los genes *vegf* y *egr-1* considerados importantes en la angiogénesis y a *wt1*, el cual es un factor de transcripción involucrado en diferentes tipos de neoplasias y es considerado un marcador universal de cáncer. En B16F10 la expresión de *wt1* resulto baja, ya que las bandas se aprecian tenues y constantes en todos los carriles, sucede lo mismo con las líneas celulares MCF7 y HEPG2, donde en el control sin tratamiento la expresión es apenas perceptible y en los demás carriles las bandas no son tan videntes. Mientras que para el gen *egr-1*, el cual está ampliamente relacionado con *wt1*, ya que este último puede modularlo tanto negativa como positivamente, vemos que en las 3 líneas neoplásicas se comporta como un constitutivo, es decir no se ve modulada su expresión, por otro lado el gen *vegf*, el cual con la ayuda de estos oligonucleótidos, amplifican 3 isoformas diferentes la VEGF121 (716pb), VEGF165 (512pb) y la VEGF145 (644pb), dos de ellas involucradas en la angiogénesis maligna (512pb y 716pb). Se aprecian en las células B16F10 las tres isoformas y no se observa un cambio significativo en la modulación de VEGF al pasar las horas. Mientras que en las células MCF7 y HEPG2 se observa que no amplifican ninguna isoforma en las células no tratadas y conforme se exponen al tratamiento aparecen dos bandas una de 716pb y la de 512pb, que posteriormente desaparecen.

En cuanto al Western blot se realizó en MCF7 solo para ver la expresión de WT1 y se aprecia como la expresión la proteína de WT1 es muy conservada.

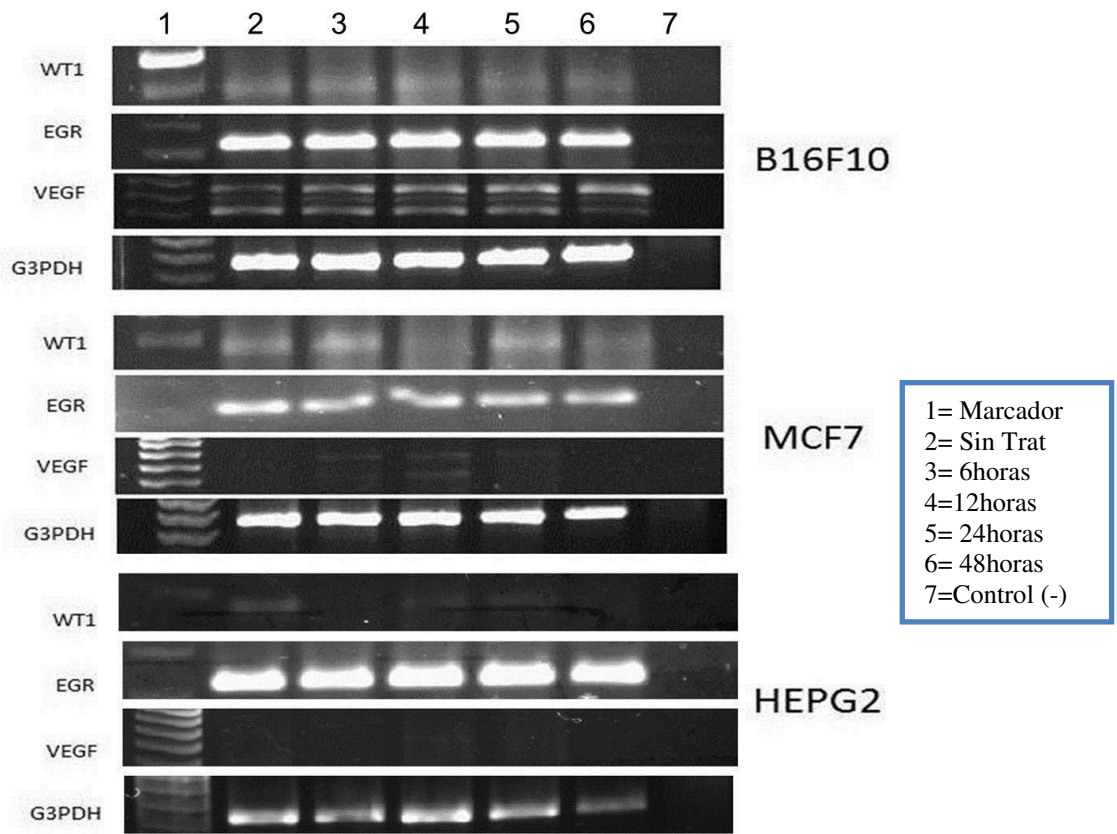


Fig. 35. Gel de agarosa al 1%, con los productos del PCR de los diferentes genes angiogénicos y wt1 en las líneas celulares B16F10, MCF7 y HEPG2. 1. Marcador de talla molecular. 2. ST, 3. Cél. Expuestas al extracto metanólico a 6h, 4. 12h, 5. 24h, 6. 48 y 7. C- (sin ADN).

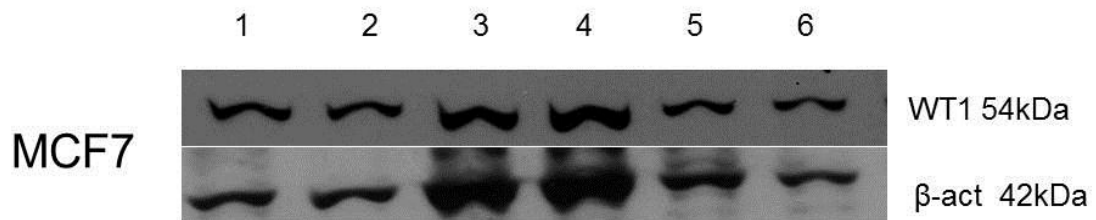


Fig. 36. Expresión d las proteínas del gen WT1, en MCF7. El carril 1, célula sin tratamiento, 2, 3, 4,5 y 6, diferentes tiempo d exposición al extracto, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h respectivamente. β-actina empleado como gen constitutivo de control de carga.

Actividad de los extractos sobre el índice tumoral en un modelo murino

Lo que corresponde a la parte *in vivo*, se encontró que tanto el extracto acuoso como metanólico de la hierba del cáncer no modificaron los pesos de los ratones significativamente, como se aprecian en las gráficas 37 en el grupo de ratones tratados con el extracto acuoso el peso disminuye al día 10 y vuelven adquirir peso para el día 15, mientras que en los ratones que consumían el extracto metanólico su peso disminuyó al día 5 y luego fue en aumento gradual.

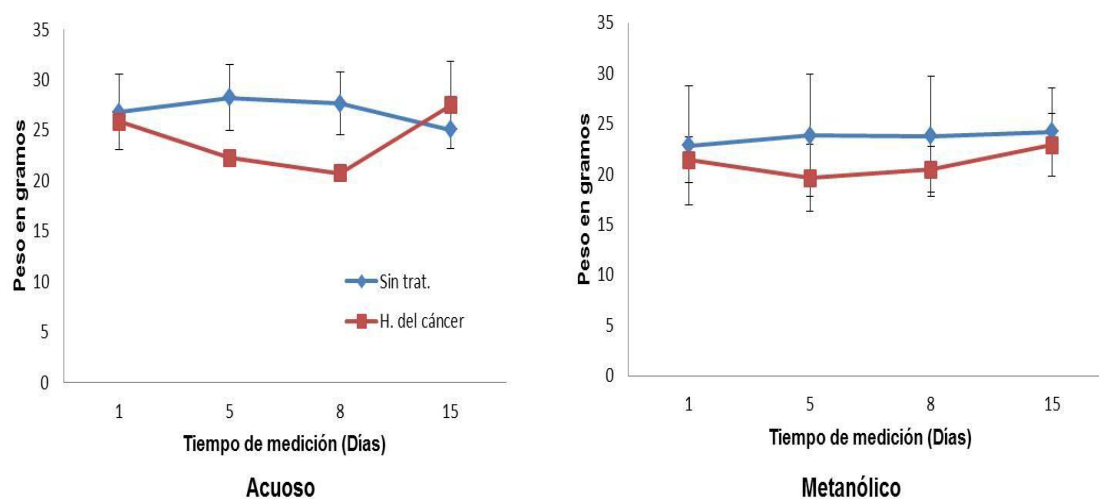


Fig. 37. Gráfica de los cambios de peso en los ratones durante ensayo *in vivo*, tanto para el extracto acuoso como para el metanólico.

Pesos de los tumores tratados y sin tratar

Pasado el periodo de experimentación se extrajeron los tumores tanto de los controles sin tratamiento como los tratados con ambos extractos, al comparar el peso de los tumores sin tratamientos con los tumores provenientes de ratones tratados con el extracto acuoso obtuvimos que existe diferencia significativa en los pesos de los tumores sin tratamiento y los tratados, resultando en que el extracto ayuda a la disminución del volumen del tumor (fig.38). Mientras que el extracto metanólico no obtuvo los resultados que se esperarían, ya que presentó mejor citotoxicidad *in vitro*, pero *in vivo*

mostró que si disminuye el tamaño de la masa tumoral, pero no significativamente, como el acuoso (fig. 39).

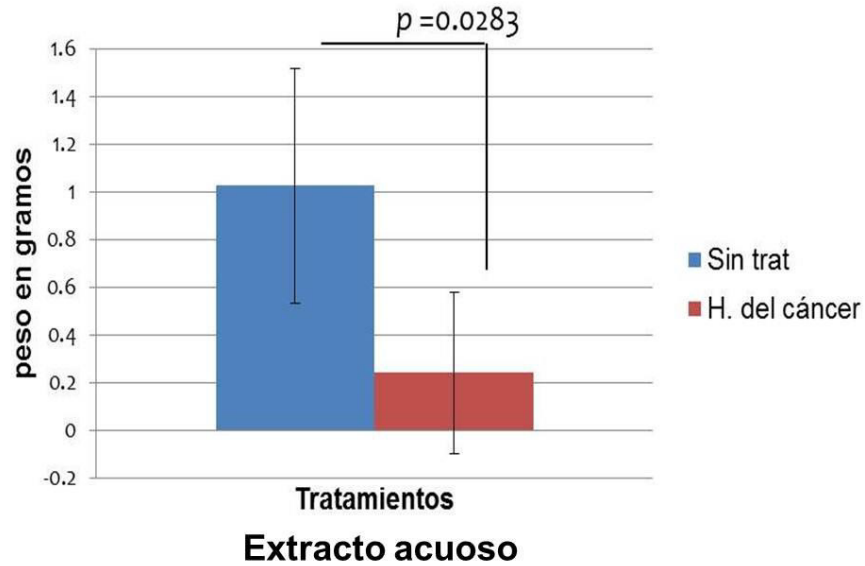


Fig. 38. Gráfica del promedio de los pesos en gramos de los tumores, tratados con el extracto acuoso y sin tratar, se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos. $p=0.0283$.

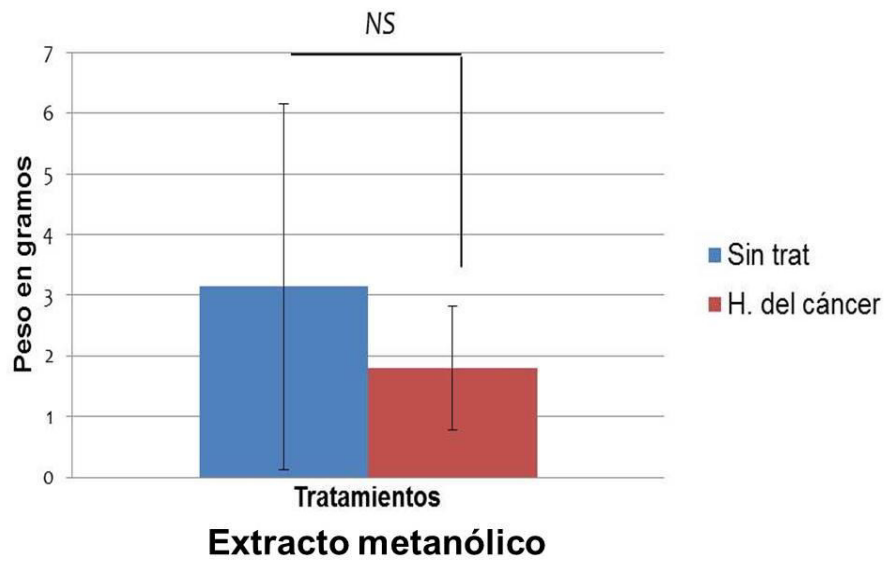


Fig. 39. Gráfica del promedio de los pesos en gramos de los tumores, tratados con el extracto metanólico y sin tratar, se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

La quimiopreención es una estrategia preventiva para inhibir, retrasar o revertir el cáncer, ya sea con agentes naturales o sintéticos, se conoce que muchos de los compuestos activos en los fármacos empleados contra diferentes neoplasias son de origen natural, con esta visión y ya que en México la medicina alternativa es ampliamente utilizada, además de contar con una gran variedad de flora a la cual se le atribuyen poderes curativos, pero que científicamente no se conoce, cómo funcionan ni cómo actúan, en este trabajo se buscó comprobar si la hierba del cáncer *Cuphea aequipetala* posee algún efecto en de contra dicha enfermedad.

En este proyecto se desarrolló el estudio de los extractos acuoso y metanólico de la planta *Cuphea aequipetala* conocida en nuestro país como Hierba del cáncer, a la cual se le adjudican entre otras cosas el tratamiento del cáncer, se analizó su capacidad para generar daño citotóxico a 5 líneas celulares diferentes y su efecto tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los hallazgos fueron que tanto el extracto acuoso, del cual ya se tenía un precedente por un trabajo previo en el laboratorio y el extracto metanólico resultaron tóxicos contra las células neoplásicas, teniendo un mayor efecto *in vitro* el extracto metanólico para todas las líneas celulares, por lo cual fue empleado para los ensayos posteriores.

En las células tratadas en este trabajo, se encontró una variación en la concentración citotóxica media del extracto acuoso de *C. aequipetala* en la línea celular MCF7 (173.54 μ g/mL), INER51 (487.20 μ g/mL) y B16F10 (364.33 μ g/mL) a las reportadas en el 2012 por Uscanga-Palomeque de 301.93 μ g/mL para la MCF7 , 205.02 μ g/mL para la INER51 y de 261.52 μ g/mL para B16F10, estas variaciones se pueden explicar debido a que el lote de la hierba no es el mismo, a la temporada que se obtuvieron las plantas, además no se trabajó con el mismo número de pase de las células.

El cálculo de la concentración citotóxica media (CC_{50}) nos mostró que el extracto metanólico es ligeramente más tóxico para las células empleadas que el acuoso, estadísticamente existe diferencia significativa entre las CC_{50} s de ambos extractos, esto mediante el análisis de *t student* con un valor de $p = 0.0113$.

Vega-Ávila y colaboradores en el 2004, usaron el extracto completo de acetona:agua (7:3) de *C. aequipetala*, presentando dosis efectivas medias de $50\mu\text{g/mL}$, $18.70\mu\text{g/mL}$ y $8.1\mu\text{g/mL}$ en las líneas Hep-2 (Carcinoma de laringe humana), HCT-15 (Cáncer de colon humano) y DU-145 (Cáncer de próstata de humano) respectivamente, así mismo obtuvieron diferentes fracciones siendo la más efectiva la de acetato de etilo con una DE_{50} de $0.418\mu\text{g/mL}$ en la línea DU-145 (Vega-Ávila et al., 2004). Además la fracción metanólica y hexánica que obtuvieron Vega-Ávila y col. no presentaron inhibición que en las líneas HCT-15 y Hep-2, sin embargo nuestra fracción metanólica fue citotóxica en todas las líneas celulares.

Se sabe que los antioxidantes incluidos los compuestos fenólicos (taninos, flavonoides y ácidos fenólicos) poseen diversos efectos biológicos como propiedades antiinflamatorias, citotóxicas y antineoplásicas (Cárdenas- Sandoval *et al.*, 2012).

Cárdenas-Sandoval y colaboradores en el 2012, revisaron el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de varios órganos de *C. aequipetala* así como el poder antioxidante. La concentración más alta de flavonoides la presentaron las hojas de *C. aequipetala* (196.83 ± 2.9 mg equivalentes de quercetina (EQ)/g PS). Mientras que la de captura de radicales libres ABTS la obtuvieron las flores de *C. aequipetala* (541.10 ± 2.32 $\mu\text{mol trolox/g PS}$) y el poder reductor más alto se observó en las hojas de *C. aequipetala* (1186.25 ± 3.17 $\mu\text{mol trolox/g PS}$), con esta información podemos ratificar que los extractos de *C. aequipetala* que obtuvimos poseen propiedades antioxidantes y pueden ser empleados en la medicina alternativa y complementaria para tratar el cáncer.

Después de observar el efecto de los extractos en células neoplásicas, para determinar que la citotoxicidad afectaba a células cancerígenas y no a células normales, se realizó el

ensayo de viabilidad con MTT en células mononucleares de sangre periférica. Las CMSP no resultaron afectadas por los extractos, ya que a las mismas dosis empleadas en contra de las células malignas, no presentaron disminución de su viabilidad, pero si fue significativo el efecto de los extractos en la proliferación, al presentar un porcentaje de viabilidad relativa de 152% con el extracto acuoso a la máxima concentración de 1.6mg/mL y el porcentaje de viabilidad fue de 147% con el extracto metanólico a una concentración de 1.36mg/mL.

Para conocer si el extracto metanólico de *C. aequipetala* era capaz de reducir o inhibir la capacidad clonal de las células de melanoma murino (B16F10), se realizó el ensayo de formación de colonias. Se ratificó que el extracto metanólico tenía un efecto en contra de la sobrevivencia de estas células neoplásicas y que además afectaba su capacidad reproductiva ya que a la concentración de 0.68mg/mL ya no existe la capacidad de formar colonias, como se observa en las figuras 15, 16 y 17.

Cabe mencionar que los resultados tanto de la viabilidad celular empleando MTT como el ensayo de formación de colonias, resultaron similares, a mayor concentración la muerte era más evidente lo que indicaba una dosis respuesta, pero se hace distinción que el ensayo de viabilidad celular por medio de MTT es una prueba que mide componentes necesarios para el crecimiento celular, mientras que el ensayo clonogénico es un ensayo reproductivo, que determina la tasa de crecimiento que depende del potencial reproductivo celular (Pratumvinit *et al.*, 2009).

Las células en apoptosis se pueden reconocer por citometría de flujo por medio de la tinción disminuida con el fluorocromo yoduro de propidio (PI) el cual es ADN específico, con este principio se realizó el ensayo del ciclo celular, para determinar en qué fase del ciclo actúa el extracto metanólico (esto en las células de melanoma murino) y confirmar que existe degradación del material genético. Los histogramas que gracias al software del FACS Acurry de BD fueron analizados, nos permitieron observar las tres fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) además de la fase SubG1 (células hipodiploides), la cual algunos investigadores la toman como células en apoptosis

(Siripong *et al.*, 2012). En las células B16F10 tratadas con el extracto metanólico, se apreció degradación del ácido nucleico, al compararlas tanto con el control negativo (sin tratamiento) como con el control positivo (etopósido). Nuestro extracto generó una degradación del material genético en fragmentos grandes que se observan como un pico desplazado al eje de las ordenadas (Fig. 18), mientras que en el control positivo se observa la típica fragmentación del ácido nucleico en fase SubG1 y en el control negativo no es significativa dicha fase.

Conforme al tiempo de exposición al extracto (24,48 y 72h), las células tratadas presentaron un aumento en el porcentaje de la fase SubG1 y disminución en G0/G1, S y G2/M, igual que el control positivo, lo cual nos ayuda a suponer que existe fragmentación del ADN y una modulación del ciclo celular por parte del extracto de *C. aequipetala*, con un posible arresto celular en G0/G1, ya que la variación de los porcentajes de PI no son significativas.

Análisis biparamétricos con Anexina y PI, por medio de citometría de flujo nos mostraron que las células tratadas con el extracto metanólico presentan características de apoptosis tardía, ya que la mayoría de las células se tiñen doble positivas (Anexina +, PI+).

Para saber si el mecanismo de muerte era dependiente o independiente de caspasas, se usó un inhibidor de caspasas de amplio espectro, llamado Q-VD-OPh, el cual inhibe a las caspasas 9/3, 8/10 y 12 (Caserta *et al.*, 2003). Se observa que el porcentaje de células anexina positivas tratadas con el inhibidor fue menor que en las células sin tratamiento (figura 26) sin embargo no se presentó diferencia estadística significativa entre las células con y sin inhibidor de caspasas, expuestas al extracto metanólico, lo cual crea contradicción ya que estos resultados indica que la muerte celular no es por apoptosis clásica estos difieren del trabajo de Uscanga-Palomeque, 2012 donde se determinó la actividad de la caspasa 3 en el extracto acuoso de la hierba del cáncer (Uscanga Palomeque 2012). Por lo cual se sugiere un mayor número de experimentos para determinar el mecanismo real de muerte celular.

Algunos tipos de muerte celular independientes de caspasas son necroptosis, paraptosis y autofagia, se tendrían que hacer otros estudios específicos para determinar si los extractos causan alguno de estos tipos de muerte mencionados.

El análisis de la fragmentación de ADN realizado a las células tratadas con el extracto metanólico nos indica fraccionamiento comparado con el control negativo. En un trabajo previo del laboratorio, se observó que el extracto acuoso de la hierba del cáncer, produce la muerte celular por medio de apoptosis (Uscanga-Palomeque, 2012), lo cual nos hace suponer que la muerte generada por el extracto metanólico podría ser por apoptosis y se necesita una mejor técnica de fragmentación del ADN para observar el patrón de bandas característico.

La tinción con Hoechst 33258 mostró cambios morfológicos significativos en la cromatina nuclear, donde se aprecia un encogimiento del núcleo en las células tratadas, además de una fluorescencia de mayor intensidad y formación de cuerpos apoptóticos, mientras que el control emite poca fluorescencia y el tamaño del núcleo es mayor que el expuesto al extracto. Lo anterior nos hace suponer que sí ocurre apoptosis o al menos la muerte que genera el extracto analizado, es un tipo de muerte celular programada, que presenta características similares a la apoptosis.

Para finalizar con la parte *in vitro* se determinó la expresión de algunos genes tanto anti como proapoptóticos, además de genes angiogénicos y del gen wt1. Los genes antiapoptóticos analizados fueron Bcl-2 y BclX_L y el proapoptótico fue BclX_S, el análisis se realizó en las células B16F10, MCF7 y en HEPG2. En B16F10 el gen BclX_L se vio modulado, en las primeras horas se incrementó su expresión y a las 48h disminuyó, mientras que en las líneas malignas humanas MCF7 y HEPG2 se expresaron ambas isoformas tanto la grande como la pequeña, y hasta la hora 48h se observó que la isoforma proapoptótica comienza a expresarse. Mientras que la expresión del gen Bcl-2 no pareció ser modulado en las líneas humanas y en la B16F10 no se logró amplificar el transcrito.

El gen *wt1*, es un factor de transcripción que está expresado en diversas neoplasias. En las líneas celulares B16F10, MCF7 y HEPG2, este gen mantuvo una expresión basal constante durante los diferentes tiempos de exposición al extracto metanólico, indicando que no hay una modulación del gen *wt1*. En este trabajo no observamos diferencia de expresión entre las tres líneas celulares, sin embargo en la línea de melanoma murino (B16F10) (Zamora-Ávila *et al.*, 2007) y las células de cáncer hepático HepG2 (Perugorria *et al.*, 2009) se ha detectado una expresión moderada del gen, mientras que en células MCF7 la expresión es apenas apreciable (Wang *et al.*, 2010).

El análisis de expresión de los genes angiogénicos se realizó en: *vegf* y *egr-1*, donde *egr-1*, está ampliamente relacionado con *wt1*, ya que este último puede modularlo tanto negativa como positivamente (Yang *et al.*, 2007), en las 3 líneas celulares estudiadas se expresó fuertemente y sin variaciones, es decir no se ve modulada su expresión, mientras que dos de las isoformas del gen *vegf* involucradas en la angiogénesis maligna VEGF121 (716pb) y VEGF165 (512pb) se aprecian en las células B16F10 pero no se observa un cambio significativo en la modulación de *vegf* al pasar las horas. Mientras que en las células MCF7 y HEPG2 sin tratamiento no expresan a VEGF pero al estar en contacto durante 6 y 12 h con el extracto metanólico de *C. aquipetala* las bandas de 716pb y de 512pb, se expresan y posteriormente desaparecen para las 48 horas.

Dado que empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa no se puede concluir si estos genes estudiados generan una proteína funcional o no, se realizó el ensayo de Western blot, donde se observa que la expresión de la proteína de Bcl-2 disminuye al paso de la exposición con el extracto metanólico y la proteína del gen Bax, un gen proapoptótico, se aprecia conservado, esto en la línea celular B16F10, con lo cual nos da la idea de que el extracto metanólico de la hierba del cáncer afecta de alguna manera la síntesis de la proteína Bcl-2, ya que al estar expuestas las células al extracto, dicha proteína antiapoptótica se ve disminuida. Lo que nos lleva a suponer que probablemente el tipo de muerte celular implicado si sea apoptosis, además que Bax, la cual es una proteína proapoptótica se expresa sin verse afectada por el extracto, haciendo posible que la apoptosis ocurra.

En conclusión los resultados *in vitro* nos deja claro que la hierba *C. aequipetala*, posee compuestos capaces de producir la muerte a células neoplásicas y que no es tóxica para las células mononucleares de sangre periférica, en cuanto a los otros ensayos para tratar de caracterizar el tipo de muerte, resulta poco prudente asegurar que la muerte celular que provoca el extracto metanólico, es apoptosis, ya que existen resultados ambiguos, por un lado ensayos nos indican posible apoptosis, como la modulación de Bcl-2, la condensación del ADN vista con la tinción de Hoechst 33258, la fragmentación del material genético y la tinción con Anexina y PI, pero por otro lado, en el ciclo celular la fase SubG1 es diferente a la fase que indica degradación del ácido nucleico y apoptosis, comparada con el control positivo (etopósido), la prueba de inhibición de caspasas que resulta ser independiente, al igual que la observación por PCR de la modulación de genes no genera nada conciso. Estos resultados indeterminados son consecuencia de la naturaleza del extracto, ya que es un extracto crudo de una planta completa, con una gran variedad de compuestos que pueden ser antagónicos entre sí, o estar generando diferentes tipos de muerte.

Por último probamos nuestros extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala in vivo* en un modelo murino, dado que se busca, el empleo de los extractos de la hierba del cáncer para uso terapéutico y que no se tiene un conocimiento sustentado científicamente de los efectos de la planta sobre organismos con neoplasias. Se probaron ambos extractos, primero para ver si no causaban toxicidad en los ratones, usando concentraciones de 5, 10 y 25mg/mL, no se registraron cambios en el comportamiento de los ratones, no presentaron evacuaciones líquidas ni sanguinolentas, de igual forma no hubo variación en los pesos de los ratones, lo cual nos da una idea de que los extractos a las dosis mencionadas no tienen efectos tóxicos a los murinos.

Por otro lado después de inducir el tumor y dar tratamiento durante 15 días, se observó diferencia significativa en los pesos de los tumores tratados con el extracto acuoso, respecto al control ($p = 0.0283$), mientras que la disminución en los pesos de los tumores tratados con el extracto metanólico no presentaron significancia. Esto nos demuestra que

lo que *in vitro* puede resultar efectivo, *in vivo* este resultado puede variar, ya que resulto ser más efectivo el extracto acuoso que el metanólico para reducir el tamaño de tumor en los ratones empleados.

Podemos concluir que ambos extractos contienen compuestos potenciales para combatir el cáncer y que son aparentemente inocuos para los ratones. Esta planta debe ser estudiada más a fondo y extraer y purificar el o los compuestos activos para dilucidar su efecto en las células neoplásicas.

CONCLUSIONES

- Los extractos tanto acuoso como metanólico de *Cuphea aequipetala* poseen efecto citotóxico sobre las líneas de cáncer, teniendo mayor efecto el extracto metanólico.
- Los extractos de *C. aequipetala* presentaron un efecto citotóxico en líneas transformadas, dependiente de la concentración del extracto empleado y el tiempo de exposición con el tratamiento.
- Los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala* no son tóxicos hacia células mononucleares de sangre periférica (CMSP).
- Las células neoplásicas de melanoma murino (B16F10), pierden su capacidad de formar colonias al ser expuestas al extracto metanólico de la hierba del cáncer.
- El extracto metanólico de *C. aequipetala* provoca condensación nuclear en las células de melanoma murino (B16F10).
- El extracto metanólico de *C. aequipetala* no ejerció algún tipo de modulación importante en los genes antiapoptóticos (*bcl-2* y *bcl-x_L*), angiogénicos (*egr-1* y *vegf*), ni en el gen *wt1* (sobreexpresado en diversas neoplasias), en las líneas celulares de: melanoma murino (B16F10); adenocarcinoma mamario humano (MCF7); ni en las células de hepatocarcinoma humano (HEPG2).
- La expresión del gen proapoptótico *bcl-x_s*, se vio aumentado solo en las líneas MCF7 y HEPG2 hasta las 48h de exposición al extracto metanólico de la hierba del cáncer.
- La proteína del gen antiapoptótico *bcl-2* disminuyo, mientras que la expresión de la proteína de Bax (proapoptótico) no se vio afectada, conforme al tiempo de exposición al extracto metanólico de *C. aequipetala*, esto en la línea celular de melanoma murino (B16F10).
- El mecanismo de muerte generado por el extracto metanólico no se logró dilucidar. El mecanismo que nosotros proponemos es un tipo de muerte celular programada, para confirmar el resultado se necesitan estudios posteriores específicos de otros tipos de muerte celular programada.

- El extracto con mayor regresión del tumor *in vivo* fue el acuoso.
- La apariencia, estado anímico y peso de los ratones tratados con los extractos acuoso y metanólico de *C. aequipetala* fueron mejor que los controles sin tratamiento.

PERSPECTIVAS

- Extracción de los compuestos efectivos dentro del extracto, por cromatografía de capa fina y purificación por HPLC, para conocer con mayor precisión la clase de muerte que está ocurriendo en las células neoplásicas.
- Corroborar por citometría de flujo empleando anexina y yoduro de propidio, si las células mononucleares de sangre periférica sufren efecto citotóxico a causa de los extractos.
- Llevar a cabo ensayos de Western blot con las pro-caspasas como la 3, 8 y 9, y con VEGF y otras proteínas angiogénicas.
- Ensayos de activación de caspasas para elucidar, si es por apoptosis, porque vía ocurre: intrínseca o extrínseca.
- Realizar ensayos de migración e invasión para conocer si los extractos afectan la metástasis.
- *In vivo* probar mezclando los extractos con quimioterapéuticos ya conocidos, para ver si existe efecto sinérgico, antagónico o si el extracto protege o disminuye los efectos de la quimioterapia.
- Estudiar el efecto inmunomodulador que puedan tener los extractos de *C. aequipetala*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad-Reyes J. Andrés, López Pérez José Luis, Santiago Carolina, Delgado Paulino, Bahsas Alí, Amaro-Luis Juan Manuel y del Olmo Esther. 2008. Productos inesperados en la transformación química de derivados de la podofilotoxona a través de la reacción de Takai. Avances en química. Volumen 3. Número 001. Universidad de los andes Merida Venezuela pp 27-34.
2. Abbas Abul K., Lichtman Andrew H. and Pillai Shiv. 2008. Inmunología celular y Molecular. Elviesier: España, pp. 397-417.
3. Aceves-Avila FJ, Medina F, Fraga A. 2001. Herbal therapies in rheumatology: The persistente of ancient medical practices. Clin Exp Rheumatol; 19:177-183.
4. Aguilar-Rodríguez Silvia, Echeveste-Ramírez Nayeli L., López-Villafranco Ma. Edith, Aguilar-Contreras Abigail, Vega-Ávila Elisa y Reyes-Chilpa Ricardo. 2012. Etnobotánica, micrografía analítica de hojas y tallos y fitoquímica de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae): Una Contribución a aa Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11 : 316 – 330.
5. Alton P. A. and Harris A. L. 1993. The role of DNA topoisomerases II in drug resistance. Br. J. Haematol., 85 241-245.
6. Argaez-Lopez N, Wacher NH, Kumate-Rodriguez J, 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 of diabetic patients in México. Diabetes care; 26:2470-2771.
7. Argueta, V. A., Cano, A. L. M. & Rodarte, M. E. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Volumen II. México. pp.731.
8. Balunas M.J., Kinghorn A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 78:431-441.
9. Baytelman, B. 1992. Acerca de Plantas y Curanderos. Etnobotánica y Antropología Médica en el Estado de Morelos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Pág. 123.
10. Betancur-Galvis, L.A., Morales G.E, Forero J.E. y Roldan J. 2002 Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of Euphorbia genus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 97:541-546.
11. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 wilms' tumor locus. Cell 60:509-520.
12. Cárdenas-Sandoval B.A., López-Laredo A.R., Martínez-Bonfil B.P., Bermúdez-Torres K. y Trejo-Tapia G. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 11, No. 3 (2012) 401-413.
13. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL.2003. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis. 4 :345-52.

14. Castro-Obregón Susana, Rao Rammohan V., Del Rio Gabriel, Chen Sylvia F., Poksay Karen S., Rabizadeh Shahrooz, Vesce Sabino, Zhang Xiao-Khun, Swanson Raymond A. Y Bredesen Dale E. 2004. Alternative, Nonapoptotic Programmed Cell Death. Mediation By Arrestin 2, Erk2, And Nur77. *J. Biol. Chem.* Vol. 279, No. 17, Pp. 17543–17553.
15. Chang F. Syrjanen S, Tervahauta A y Syrjanen K. 1993. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br. J. Cancer*, 68: 653-661
16. Ching Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. 2006. Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 8: 239-253
17. Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. & McCloud, T.G. 1994. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. In "Ethnobotany and the Search for New Drugs". Ciba Foundation Symposium 185. Chadwick, D.J. & Marsh, J. eds. Chichester, United Kingdom, Wiley & Sons. pp 178-196.
18. Cragg, G.M. & Newman, D.J. 2004. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *J. Nat. Prod.* 67: 232-244.
19. De Mestre, A.M. Rao S., Homby J.R., Soe-Htwe T., Khachigian L.M., Hulett M.D. 2005. Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 280 : 35136-47.
20. De Toro Gonzalo. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis, necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica Octubre 2006.
21. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, y Martinou J. 1998. Bax-induced Cytochrome C Release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ Ions. *J. Cell Biol.* 143: 217-224
22. Fan, Y., Weinstein, J.N., Kohn, K.W., Shi, L. M. & Pommier, Y. 1998. Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J. Med. Chem.* 41:2216-2226.
23. Ferrara N., LeCourter J. y Lin R. 2002. Endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and the hypothesis of tissue-specific regulation of angiogenesis. *Endocr Res.* 28: 763-4.
24. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL. 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1371–1388.
25. Gómez-Martínez Ricardo, Tlacuilo-Parra Alberto and Garibaldi-Covarrubias Roberto. 2006. Use of Complementary and Alternative Medicine in Children with Cancer in Occidental, México. *J Pediatr Blood Cancer* ;DOI 10.1002 pbc. 21101 1-5
26. González A.G, Valencia E, Siverio ET, Bermejo BJ, Gupta MP. 1994. Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: A new triterpene from *C. carthagenensis*. *Planta Med.* 60: 592 - 593.
27. Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *J. Molecular Aspects of Medicine* 27:1

28. Hanada M, Aimé-Sempé C, Sato T, Reed JC. 1995. Structure-function Analysis of Bcl-2 Protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax J. Biol. Chem. 270: 11962-11969.
29. Hanahan Douglas y Weinberg Robert A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144. Elsevier
30. Hellman, S. & Vokes, E. E. 1996. Advancing current treatments for cancer. Sci. American 275:84-89.
31. Horwitz, S.B. 2004. Personal recollections on the early development of taxol. J. Nat. Prod. 67:136-138.
32. Husain, I., Mohler, J.L., Seigler, H.F. & Besterman, J. M. 1994. Evaluation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. Cancer Res. 54:539-546.
33. Kelly KM. 2004. Complementary and alternative medical therapies for children with cancer. Eur J Cancer; 40:2041-2046.
34. Kindt Thomas J., Goldsby Richard A. y Osborne Barbara A. 2007. Inmunología de Kuby. 6ta Edición. McGraw-Hill Interamericana, México. pp. 525-545
35. Knudson CM, Korsmeyer SJ. 1997. Bcl-2 and Bax function indeoendently to regulate cell death. Nat. Genet. 16: 358-363.
36. Laundry de Mesquita Mariana, de Paula José Elias, Pessoa Cláudia, de Moraes Manoel Odorico, Veras Costa-Lotufó Letícia, Grougnet Raphael, Sylvie Michel, Tillequin Francois y Salmen Espindola Laila. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 123: 439-445
37. López L. 2001. Inducción de apoptosis en células HeLa por extractos de Cupressus Lindley Klotzsch. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias UNAM. 35pp.
38. López L. Villavicencio M. A. Albores A. Martínez M. De la Garza J., Meléndez-Zajgla J., y Maldonado V. 2002. *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) Leaf extract induces apoptosis in cancer cells J. Ethnopharmacol. 80: 115-120.
39. Gattinoni Luca, Powell Daniel J., Rosenberg Steven A. and Restifo Nicholas P. 2006. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat. Rev. Immunol. 6: 383-393.
40. Mayo MW, Wang C, Droulin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman E, Baldwin AS. 1999. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 propo-oncogene. The EMBO Journal, 18: 3990-4003
41. Mena Rejon G., Caamal-Fuentes E., Cantillo-Ciau Z., Cedillo-Rivera R., Flores-Guido J., Moo-Puc R. 2009. *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology 121: 462-465
42. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. 1998. The wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene? Int Rev Cytol;181:151-212.
43. Moujalled DM, Cook WD, Murphy JM y Vaux DL. 2014. Necroptosis induced by RIPK3 requires MLKL but not Drp1. Cell Death and Disease, Nature Publishing Group.

44. Moura M.D. Silva J. S. Oliveira R.A.G. Diniz M.F.F.M. y Barbosa-Filho J.M. 2002. Natural Products reported as potencial inhibitors of uterine cervical neoplasia Acta. Farm. Bonaerense 21 (1):67-74.
45. NANDA Internacional. 2003. Diagnósticos enfermeros: Definiciones y Clasificación 2003 – 2004. Elsevier España Health Sciences Division S.A. pág 287.
46. Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17:215-234.
47. Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66:1022-1037.
48. Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70, 461–477.
49. Nicolaou, K.C., Guy, R. K & Potier, P. 1996. Taxoids: New weapons against cancer. *Sci. American* 274: 84-88.
50. NIH panel on definition and description. 1997. Defining and describing complementary and alternative medicine. *Alternat Ther Health Med*:3:49-57.
51. Orberlies, N. H. & Kroll, D.J. 2004. Camptothecin and Taxol: historic achievements in natural products research. *J. Nat. Prod.* 67:129-135.
52. Patwardhan B, Vaidya A.D.B., Chorghade M. 2004. Ayurveda and natural products drug discovery. *Curr. Sci.* 86:789-99
53. Pérez-Castorena AL, Maldonado E. 2003. Triterpenes and flavonoid glycosides from *Cuphea wrightii*. *Biochem Syst Ecol.* 31: 331 - 334.
54. Perugorria Maria J., Castillo Josefa, Latasa Ujue, Goní Saioa, Segura Victor, Sangro Bruno, Prieto Jesús, Avila Matías A. and Berasain Carmen .2009. Wilms' Tumor 1 Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma Promotes Cell Dedifferentiation and Resistance to Chemotherapy. *Cancer Res* 69:1358-1367.
55. Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plants components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology* 100, 57–60.
56. Pratumvinit B., Srisapoomi T., Worawattananon P., Opartkiattikul N., Jiratchariyakul W. y Kummalue T. 2009. *In vitro* antineoplastic effect of *Ficus hispida* L. plant against breast cancer cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3 pp. 255-261
57. Ramawat K.G., Dass S. and Mathur Meeta, 2009. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. In the book: *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, K.G. Ramawat (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 7-32.
58. Ramawat K.G, Goyal S. 2008. The Indian herbal drugs scenario in global perspectives. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds) *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 323
59. Rowinsky, E. K. & Donehower, R. C. 1995. Paclitaxel. *N. Engl. J. Med.* 443:1004 -1014.
60. Sacoman J.L., Monteiro K.M., Possenti A., Figueira G.M., Foglio M.A. and Carvalho J.E. 2008. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellate*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41(5): 411-415

61. Scharnhorst V, Dekker P. Van-der-Eb AJ, Jochemsen AG. 2000. Physical Interaction between Wilms Tumor 1 and p73 proteins Modulates Their Functions *J. Biol. Chem.* 275:10202-10211
62. Shu, Y-Z. 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61:1053-1071.
63. Shimizu Shigeomi, Kanaseki Toku, Mizushima Noboru, Mizuta Takeshi, Arakawa-Kobayashi Satoko, Thompson Craig B. Y Tsujimoto Yoshihide. 2004. Role Of Bcl-2 Family Proteins In A Non Apoptotic Programmed Cell Death Dependent On Autophagy Genes. *Nature Cell Biology* vol. 6, núm. 12.
64. Silva, J.S., Moura, M.D., Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F. & Barbosa-Filho, J. M. 2003. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine* 10:221-232.
65. Siripong Pongpun, Rassamee Kitiya, Piyaviriyakul Suratsawadee, Yahuafai Jantana, Kanokmedhakul Kwanjai. 2012. Anti-metastatic Effects on B16F10 Melanoma Cells of Extracts and Two Prenylated Xanthenes Isolated from *Maclura amboinensis* Bl. Roots. *Asian Pacific J Cancer Prev, Vol. 13*, 3519-3528
66. Sjostrom J, Bergh J. 2001. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*, 322:1538-1539.
67. Soussi T. De-Fromentel C and May P. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5: 945-952.
68. Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* Pág. 1066-75.
69. Suffness, M. & Douros, J. 1982. Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* 45:1-14.
70. Suffness, M. & Pezutto, J. M. 1991. Assays related to cancer drug discovery. In "Methods in Plant Biochemistry". Hostettmann, K., ed. Academic Press Limited. Vol 6. pp71-133.
71. Tannock, I. F. & Hill, R. P. 1998. The Basic Science of Oncology. 3rd edition. *McGraw-Hill*. USA.
72. Testa U., Pannitteri G. y Condorelli G.L. 2008. Vascular endotelial growth factors in cardiovascular medicine. *J. Cardiovasc Med (Hagerstown)* 9: 1190-1221.
73. Uscanga-Palomeque A. C. 2012. Efecto Citotóxico de los extractos acuosos de las plantas *Hemiangium excelsum*, *Cuphea aequipetala*, *Acalypha mexicana* y *Tabernaemontana Australis* en líneas celulares de cáncer. Tesis de Licenciatura UANL-FCB, Monterrey, N.L., México.
74. Vega-Ávila E, Tapia-Aguilar R, Jiménez-Estrada M, Villarreal-Ortega ML, Ramos RR. 2004. Cytotoxic activity of *Cuphea aequipetala*. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 47: 129 - 133.
75. Vera Janavel G., Crottogini A., Cabeza Meckert P., Cuniberti L. 2006. Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep. *Gene Ther.* 13 (15): 1133-1142.
76. Villarreal, M.L. Alonso, D., Melesio, G. 1992. Cytotoxic activity of some Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia* 63:518-22.

77. Villavicencio Nieto M.A. Pérez Escandón B.E. Mendoza Pérez E.2008. Citotoxicidad en células HeLa de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotanica* 26 :137-147.
78. Waizel – Bucay J; Martínez Porcayo G., Villarreal Ortega M. L. Alonso Cortés D. Pliego Castañeda A. 2003. Estudio preeliminar etnobotánico; fitoquímico; de actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala*. Cav (Lythraceae). Instituto Politécnico Nacional Distrito Federal, México. *Polibotanica* 15: 99-108.
79. Wang Lei, Zhang Xintian and Wang Zhao-Yi. 2010. The Wilms' Tumor Suppressor WT1 Regulates Expression Of Members Of The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) And Estrogen Receptor In Acquired Tamoxifen Resistance. *Anticancer Research* 30: 3637-3642
80. Warber, S. 1999. Models of action at target sites. In "Natural Products from Plants". Kaufman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A. & Brielmann, H.L. eds. *CRC Press*. pp 158-181.
81. Xiao Z., Vance J.R., Bastow K. F., Brossi A., Wang H-K and Lee H-K. 2004. Antitumor agents Part 235: Novel 4'-ester etoposide analogues as potent DNA topoisomerase II inhibitors with improved therapeutic potencial. *BioOrg. Med. Chem.*, 12: 3363-3369
82. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F and Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story (Review). *Leukemia* 21:868–876.
83. Zamora-Avila DE , Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D, Zapata-Benavides P. 2007. RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res.* 6:341-8.

BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

1. American Cancer Society 2010. [On line] Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002996-pdf.pdf>
2. American Cancer Society, 2013. [On line] Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-treating-hormone-therapy>
3. Definición de cáncer del Instituto Nacional de Cáncer NIH 2012 [On line] Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
4. Descripción de *Cuphea aequipetala* [On line] Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lythraceae/cuphea-aequipetala/fichas/ficha.htm#2.%20Origen%20y%20distribuci%C3%B3n%20geogr%C3%A1fica>
5. Instituto de Cáncer Winship, 2008 [On line] Disponible en: <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=540&lang=spanish>
<http://www.cancerquest.org>
6. Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI, 2011) [On line] Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
7. Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI, 2011). [On line] Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2825&ep=82>
8. Instituto Nacional del Cáncer, de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. (NIH) 2012 [On line] Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/terapia-hormonal-seno>
9. Organización Mundial de la Salud (2014). Cáncer. [On line] Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
10. Organización Mundial de la Salud (2014). Cáncer. Nota descriptiva N°297 febrero 2014. [On line] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
11. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [On line] Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
12. Organización Panamericana de la Salud. 2014 [On line] Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=es
13. Universidad del estado de Pennsylvania.. 2013. [On line] Disponible en: <http://www.research.psu.edu/arp/experimental-guidelines/administration-by-oral-gavage>

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ashanti Concepción Uscanga Palomeque

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO CITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO DE *Cuphea aequipetala*, SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER Y UN MODELO MURINO.

Campo de estudio: Ciencias Naturales

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 5 de Diciembre de 1988, hija de Luis Arturo Uscanga León y María Luisa Palomeque Garza.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo, en el 2010, primer lugar de carrera y de generación.

Experiencia profesional: Asistente de investigación en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer desde el 2010.

ANEXOS

Tabla 8. Efecto en la viabilidad celular causada por el extracto acuoso de *C. aequipetala* en las diferentes líneas celulares B16F10, MCF7, INER51, HEPG2 y HEK293.

<i>Cuphea aequipetala</i> extracto acuoso										
Conc.	B16F10		MCF7		INER51		HEPG2		HEK293	
mg/mL	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std
C-	100.00	4.77	100.00	1.77	99.97	0.87	100.00	1.34	99.96	6.57
[0.05]	120.99	7.36	121.06	0.38	94.35	2.20	101.52	2.69	115.60	4.29
[0.1]	101.96	6.25	58.09	1.95	90.27	4.34	101.11	1.28	59.04	1.30
[0.2]	85.48	2.41	14.04	3.80	50.78	0.99	51.62	3.15	17.64	2.67
[0.4]	46.87	2.39	4.54	0.33	9.46	0.69	4.40	0.61	3.94	0.49
[0.6]	29.03	4.16	4.54	0.79	7.79	1.22	2.88	0.07	3.81	0.46
[0.8]	16.01	2.24	3.49	0.44	9.80	0.31	2.98	0.57	4.98	1.17

Tabla 9. Efecto en la viabilidad celular causada por el extracto metanólico de *C. aequipetala* en las líneas celulares B16F10, MCF7, INER51, HEPG2 y HEK293.

<i>Cuphea aequipetala</i> extracto metanólico										
Conc.	B16F10		MCF7		INER51		HEPG2		HEK293	
mg/mL	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std	%Viabilidad	Desvest Std
C-	100.00	1.27	99.96	0.20	99.93	8.40	100.00	0.12	99.94	3.36
[0.042]	122.16	3.11	88.32	3.99	114.47	3.40	102.63	2.30	117.97	4.90
[0.085]	107.11	3.01	28.85	3.07	79.93	3.02	84.83	1.96	58.74	4.19
[0.17]	71.43	2.82	9.67	1.05	35.25	4.68	10.03	1.77	9.80	1.13
[0.34]	40.34	2.81	3.09	0.33	7.02	1.49	3.04	1.38	7.20	0.73
[0.51]	22.65	2.10	5.19	0.72	7.80	0.25	2.83	0.61	6.05	1.37
[0.68]	8.34	0.80	3.53	0.78	7.80	0.68	3.28	0.37	7.56	0.10

Tabla 11. Efecto en la viabilidad celular del extracto acuoso y metanólico de *C. aequipetala* sobre las células mononucleares de sangre periférica.

<i>Cuphea aequipetala</i> extracto acuoso			<i>Cuphea aequipetala</i> extracto metanólico		
Conc.	CMSP		Conc.	CMSP	
mg/mL	%Viabilidad	Desvest Std	mg/mL	%Viabilidad	Desvest Std
C-	100.04	1.77	C-	100.00	1.76
[0.05]	105.58	2.38	[0.042]	104.80	2.23
[0.1]	107.96	3.22	[0.085]	106.89	3.07
[0.2]	122.26	1.31	[0.17]	121.12	1.45
[0.4]	113.09	0.48	[0.34]	116.54	3.24
[0.6]	116.27	6.85	[0.51]	118.21	3.24
[0.8]	135.60	6.41	[0.68]	129.83	3.24
[1.6]	152.29	8.58	[1.36]	147.93	5.03