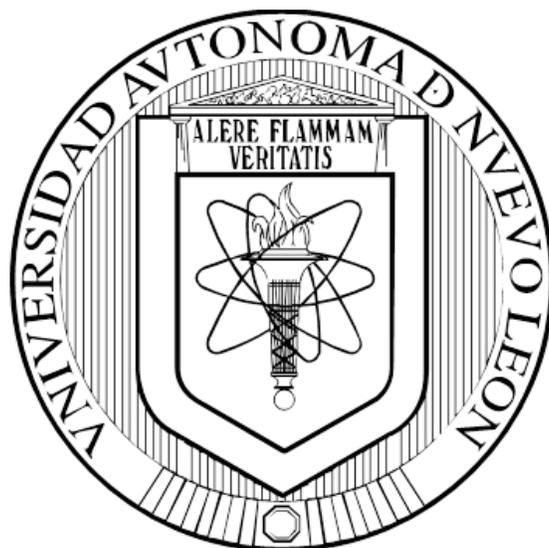


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL, INMUNOMODULADORA
Y HEPATOTOXICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *PACHYCEREUS*
MARGINATUS (DC.) BRITTON & ROSE EN UN MODELO MURINO

POR

M.C. HUMBERTO CARLOS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

ENERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL, INMUNOMODULADORA
Y HEPATOTOXICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *PACHYCEREUS*
MARGINATUS (DC.) BRITTON & ROSE EN UN MODELO MURINO

POR

M.C. HUMBERTO CARLOS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

ENERO, 2017

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD, ANTITUMORAL, INMUNOMODULADORA Y
HEPATOTOXICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.)
BRITTON & ROSE EN UN MODELO MURINO.

Comité de tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director

Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Secretario

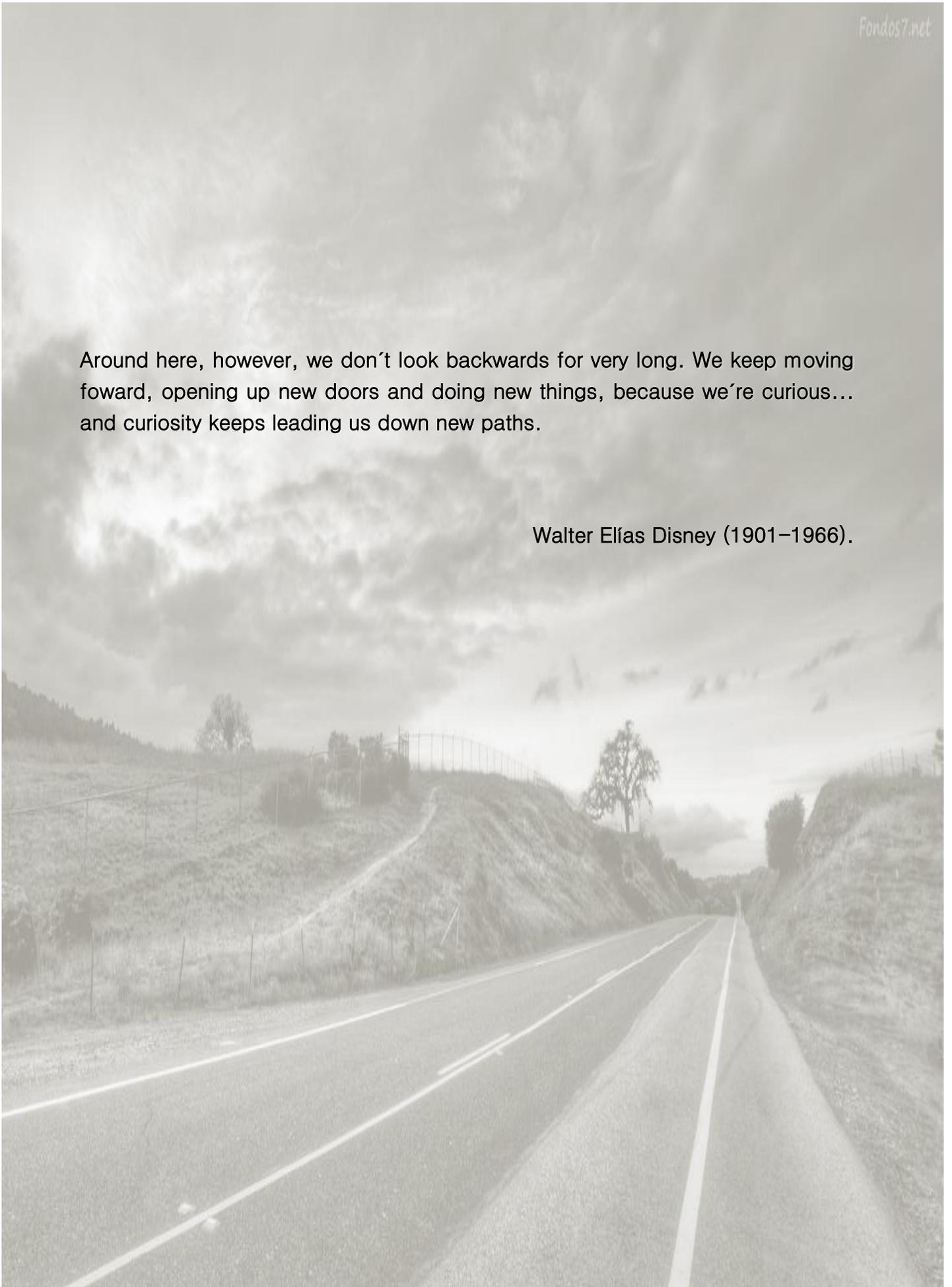
Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious... and curiosity keeps leading us down new paths.

Walter Elías Disney (1901–1966).



AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme la formación profesional.

Al Dr. Ricardo A. Gómez Flores, por su valiosa asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por creer en mí dándome nuevamente la oportunidad de crecer profesional y personalmente.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra y al Dr. Ramiro Quintanilla Licea, por su amable disposición y su valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No.351560 para el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Edgar Mendoza y al Dr. Moisés Franco, por su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para realizar este trabajo.

A la Biol. Enriqueta Monreal Cuevas y a la Srita. Nora Mares, por el gran cariño que les tengo y por las vivencias inolvidables.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios UIAD, UFB y Fitoquímica, por la importancia que tuvo para mí, sus comentarios, reflexiones y críticas constructivas en todo momento, ayudándome a sacar el trabajo adelante.

A mi familia, sobre todas las cosas, por su apoyo incondicional que me dieron durante la carrera y durante la realización de este trabajo, desde el inicio hasta el final.

A todas aquellas personas que involuntariamente omito, que de una u otra forma me apoyaron cuando de alguna manera lo necesitaba.

MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme protección, fe y fortaleza para seguir adelante.

A mis padres, Norma Cristina Martínez y Humberto Nazario Hernández, por confiar en mí, por enseñarme que no hay camino difícil para lograr lo que uno se propone, por los sacrificios y esfuerzos que pasamos para llegar a donde estoy.

A mis hermanos Stephanie Cristina y Abad Esaú, por compartir sueños, alegrías y tristezas, por ser cómplices de pequeñas travesuras y por muchas cosas más.

A mi amada esposa Lucila Guadalupe y mi pequeña cachorrita Renata Guadalupe, por el gran amor que les tengo y por su valioso apoyo incondicional que me han brindado, por sus alegrías que me motivan a seguir adelante día con día.

A toda mi familia que me ha apoyado desde siempre.

LOS QUIERO MUCHO.

INDICE

| Sección | Página |
|--|--------|
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| DEDICATORIA..... | v |
| INDICE DE TABLAS..... | xi |
| INDICE DE FIGURAS..... | xii |
| NOMENCLATURA..... | xv |
| RESUMEN..... | xvi |
| ABSTRACT..... | xvii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| Plantas medicinales | 3 |
| Aspectos generales de la familia <i>Cactacea</i> | 5 |
| <i>Pachycereus marginatus</i> | 7 |
| Botánica..... | 8 |
| Fitoquímica..... | 10 |
| Estudios previos..... | 10 |
| Cáncer..... | 10 |
| Terminología de cáncer..... | 11 |
| Linfoma L5178YR..... | 12 |
| Proliferación tumoral..... | 13 |
| Toxicología..... | 13 |
| Intoxicaciones por plantas..... | 15 |

| | |
|---|-----------|
| Metabolismo de fármacos..... | 16 |
| Función hepática..... | 17 |
| Hepatotoxicidad..... | 17 |
| 3. JUSTIFICACION..... | 20 |
| 4. HIPOTESIS..... | 21 |
| 5. OBJETIVOS..... | 21 |
| Objetivo general..... | 21 |
| Objetivos particulares..... | 21 |
| 6. MATERIAL Y METODO..... | 22 |
| Estrategia experimental..... | 22 |
| Reactivos y medios de cultivo..... | 23 |
| Animales de experimentación..... | 23 |
| Purificación de compuestos..... | 23 |
| Material vegetal..... | 23 |
| Extractos crudos de <i>P. marginatus</i> | 24 |
| Extracción Soxhlet..... | 24 |
| Evaporación con rotavapor..... | 24 |
| Preparación de tratamientos a partir de los extractos crudos..... | 25 |
| Línea celular L5178Y-R..... | 25 |
| Mantenimiento <i>in vivo</i> de la línea celular L5178YR..... | 25 |
| Mantenimiento <i>in vitro</i> de la línea celular L5178YR..... | 26 |
| Congelación de las líneas celulares..... | 26 |
| Descongelación de las línea celulares..... | 27 |
| Determinación de la viabilidad celular..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> en contra del linfoma murino L5178YR..... | 27 |
| Análisis de la fragmentación de ADN..... | 28 |
| Extracción de ADN..... | 28 |
| Detección de fragmentos de ADN..... | 29 |
| Obtención de linfocitos de ratón del timo y bazo..... | 29 |
| Evaluación de la actividad linfoproliferativa de los extractos de <i>P. marginatus</i> con linfocitos residentes y activados..... | 29 |
| Determinación de la actividad antitumoral <i>in vivo</i> | 30 |
| Prueba de hepatotoxicidad <i>in vivo</i> | 32 |
| Actividad hepatotóxica <i>in vivo</i> | 32 |
| Actividad antioxidante con DPPH..... | 2 |
| Análisis estadísticos..... | 32 |
| 7. RESULTADOS..... | 34 |
| Obtención de los extractos de <i>P. marginatus</i> | 34 |
| Análisis de la actividad citotóxica de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre el crecimiento de la línea celular L5178YR..... | 34 |
| Análisis de la mortalidad celular inducida por los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> | 36 |
| Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo y bazo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno..... | 38 |
| Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno..... | 38 |
| Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> sobre la proliferación de linfocitos de bazo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno..... | 42 |
| Análisis de la actividad antitumoral <i>in vivo</i> de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre el linfoma L5178Y-R..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Efecto de la partición acuoso-metanol sobre el crecimiento tumoral... | 46 |
| Efecto de la partición acuoso-metanol sobre la supervivencia de ratones con linfoma..... | 49 |
| Análisis de la actividad antioxidante de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> mediante la prueba con DPPH..... | 52 |
| Análisis cualitativo de la actividad antioxidante de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> mediante la prueba con DPPH..... | 52 |
| Análisis cuantitativo de la actividad antioxidante de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> mediante la prueba con DPPH..... | 53 |
| Análisis de la evaluación hepatotóxica de los extractos crudos <i>P. marginatus</i> | 54 |
| Evaluación de la función hepática <i>in vivo</i> | 55 |
| Análisis histológico del hígado <i>in vivo</i> tratado con la partición acuoso-metanol de <i>P. marginatus</i> | 56 |
| 8. DISCUSION | 61 |
| 9. CONCLUSIONES | 65 |
| 10. PERSPECTIVAS | 66 |
| 11. BIBLIOGRAFIA | 67 |
| 12. RESUMEN BIOGRAFICO | 73 |
| 13. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACION | 74 |
| 14. ANEXOS | |

INDICE DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| 1. | Clasificación taxonómica de <i>P. marginatus</i> | 8 |
| 2. | Grados de toxicidad..... | 14 |
| 3. | Grupos experimentales en los ensayos <i>in vivo</i> | 31 |
| 4. | Efecto de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de mitógeno | 39 |
| 5. | Efecto de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre la proliferación de linfocitos de bazo <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de mitógeno | 43 |
| 6. | Efecto de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> | 48 |
| 7. | Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de ratones con linfoma L5178Y-R..... | 50 |
| 8. | Peso corporal de los ratones antes y después de los tratamientos..... | 54 |
| 9. | Niveles de las enzimas hepáticas en los diferentes grupos tratados con los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> | 55 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. <i>Cantharanthus roseus</i> | 4 |
| 2. Distribución de los cactus en continente americano..... | 5 |
| 3. Usos de cactus | 7 |
| 4. Flor de <i>P. marginatus</i> | 9 |
| 5. Uso de <i>P. marginatus</i> como cerca viva..... | 9 |
| 6. Vista de la línea celular L5178Y-R en cultivo..... | 12 |
| 7. Tipos de intoxicaciones..... | 15 |
| 8. Orientación del hígado en el cuerpo humano..... | 16 |
| 9. Estrategia de experimentación..... | 22 |
| 10. Alimentación e hidratación a ratones de laboratorio..... | 23 |
| 11. Inoculación intraperitoneal de células tumorales..... | 26 |
| 12. Protocolo de ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> contra células del linfoma murino..... | 28 |
| 13. Obtención de suspensiones celulares..... | 29 |
| 14. Protocolo de ensayo de linfoproliferación <i>in vitro</i> con células de timo y bazo..... | 30 |
| 15. Efecto citotóxico de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> , hexano, cloroformo, metanol y partición acuoso-metanol, contra la línea linfoide L5178Y-R. | 35 |
| 16. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con los extractos crudos. | 36 |
| 17. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con los extractos crudos a las 12h. | 37 |
| 18. Efecto de los extractos crudo de hexano y cloroformo de <i>P. marginatus</i> sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 19. Efecto de los extractos crudo de metanol y la partición acuosa-metanol de <i>P. marginatus</i> sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno | 41 |
| 20. Efecto de los extractos crudo de hexano y cloroformo de <i>P. marginatus</i> sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. | 44 |
| 21. Efecto de los extractos crudo de metanol y la partición acuosa-metanol de <i>P. marginatus</i> sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. | 45 |
| 22. Efecto de los tratamientos sobre la sobrevivencia de ratones con linfoma. | 51 |
| 23. Efecto antioxidante de los extractos crudo de hexano, cloroformo, metano y la partición acuosa-metanol de <i>P. marginatus</i> mediante la técnica de neutralización del radical de DPPH. | 52 |
| 24. Efecto antioxidante de los extractos crudo de hexano, cloroformo, metanol y la partición acuosa-metanol de <i>P. marginatus</i> utilizando placa de 96 pozos para cuantificar la actividad antioxidante mediante la neutralización del radical DPPH. | 53 |
| 25. Corte histológico de hígado (100x), mostrando a detalle las características de los hepatocitos. Tinción con hematoxilina y eosina. | 57 |
| 26. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con el extracto crudo de hexano de <i>P. marginatus</i> | 57 |
| 27. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con el extracto crudo de cloroformo de <i>P. marginatus</i> | 58 |
| 28. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con el extracto crudo de metanol de <i>P. marginatus</i> | 58 |
| 29. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con el extracto crudo de la partición acuoso-metanol de <i>P. marginatus</i> | 59 |
| 30. Triada portal hepática, corte teñido con hematoxilina y eosina (10x).. | 59 |
| 31. Triada portal hepática, corte teñido con hematoxilina y eosina (40x).. | 60 |

NOMENCLATURA

| | |
|------------------------|--|
| A₅₇₀ | Absorbancia a 570 nm |
| ADN | Ácido Desoxiribunocleico |
| Act-D | Actinomicina D |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| cm | Centímetro |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| FC | Fracción |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| IC | Índice de crecimiento |
| <i>im</i> | Intramuscular |
| <i>ip</i> | Intraperitoneal |
| <i>iv</i> | Intravenosa |
| L | Litro |
| M | Metro |
| μL | Microlitro |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio |
| μg | Microgramo |
| μg/mL | Microgramos por mililitro |
| mM | Micromolar |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mm | Milimetro |
| min | Minuto |
| nm | Nanómetros |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltio |

RESUMEN.

El cáncer es una de las principales causa de muerte a nivel mundial, junto con las cardiopatías y la diabetes. Debido a que con el tiempo las células cancerosas suelen presentar resistencia y presentar tolerancia a los tratamientos convencionales, es importante la búsqueda y evaluación de compuestos activos con mejor actividad citotóxica con mínimos efectos secundarios. El cactus *Pachycereus marginatus* es nativo de México y en la medicina tradicional se ha recomendado únicamente para tratar la diabetes; sin embargo, muestra una relación filogenética muy similar a *Lophocereus schottii*, el cual ha mostrado tener importante actividad sobre células tumorales HeLa (cáncer cérvico uterino), así como actividad antibiótica sobre las bacterias *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes* y *Salmonella typhi*. Inicialmente se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de *P. marginatus* sobre la línea tumoral L5178Y-R y su efecto inmunomodulador empleando la técnica de MTT, y se observó que los extractos crudos presentaban efectos citotoxicos contra las células tumorales con mínimos efectos sobre las células del sistema inmune nativas. Posteriormente en bioensayos *in vivo* se evaluó la actividad del extracto crudo sobre el linfoma L5178Y-R y los posibles efectos toxicológicos en el hígado, evaluando la función hepática y su integridad mediante cortes histológicos, observando disminución significativa en el tumor y sin afectar la funcionalidad hepática. Los resultados obtenidos con este proyecto permiten validar científicamente el uso de este cactus como planta medicinal para terapia antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death globally, along with heart disease and diabetes. Because cancer cells are usually resistant and present tolerance to conventional treatments, it is important to search for and evaluate active compounds with better cytotoxic activity with minimal side effects. The cactus *Pachycereus marginatus* is native to Mexico and in traditional medicine has been recommended only to treat diabetes; However, shows a phylogenetic relationship very similar to *Lophocereus schottii*, which has been shown to have important activity on HeLa (cervical cancer) tumor cells, as well as antibiotic activity on the bacteria *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhi*. We initially evaluated the in vitro cytotoxic activity of *P. marginatus* on the L5178Y-R tumor line and its immunomodulatory effect using the MTT technique, and it was observed that the crude extracts presented cytotoxic effects against tumor cells with minimal effects on the cells. Immune system. Subsequently, in vivo bioassays the activity of the crude extract on L5178Y-R lymphoma and possible toxicological effects in the liver were evaluated by evaluating liver function and integrity through histological sections, observing a significant decrease in the tumor and without affecting hepatic function . The results obtained with this project allow to scientifically validate the use of this cactus as a medicinal plant for antitumor therapy.

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Cactaceae* es un grupo de plantas que comprende 1500 especies (Hunt 1999). Están distribuidas desde Peace River en British Columbia y Alberta Canadá, hasta la Patagonia en Argentina, y desde el nivel de mar en las dunas costeras, hasta 5100m de elevación en Perú (Bravo-Hollis y Scheinvar 1995). Un grupo importante de cactáceas son las columnares y en México existen aproximadamente 70 especies de este tipo (Valiente-Banuet *et al.* 1996). En las culturas indígenas de México los cactus representan una base económica importante (Arias *et al.*, 2012; Bravo- Hollis 1978; Felger y Moser 1991).

P. marginatus es una especie perteneciente a la familia de las *Cactaceae*, comúnmente conocida con los nombres de chilayo, cereus grande, cactus órgano o simplemente órgano (Bravo-Hollis y Scheinvar 1995). El cactus es endémico de México y se distribuye por los estados de Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla, actualmente se ha extendido su cultivo en todo el mundo debido a su uso como cerca viva y ornato.

En la medicina tradicional únicamente es recomendado para tratar la diabetes, sin embargo, no hay reportes sobre su uso contra células tumorales. *P. marginatus* presenta una relación filogenética estrecha con el cactus *Lophocereus schottii*, el cual ha mostrado tener actividad citotóxica contra células tumorales HeLa (cáncer cérvico uterino) (Morales-Rubio *et al.* 2006). Se han aislado de *L. schottii* los compuestos de pilocerina y lofocina, que han mostrado tener actividad citotóxica (Wani-Mansukh *et al.* 1980).

El término cáncer se refiere específicamente a un crecimiento progresivo e invasor, que puede presentar metástasis (Qian *et al.* 2001). Dado que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y que adquiere resistencia a fármacos (ACS, 2012), es importante encontrar alternativas para su tratamiento sin producir efectos secundarios.

Debido a que los tratamientos para tratar el cáncer tienden a causar cierto grado de toxicidad sobre el paciente, es importante el uso de alternativas como tratamiento sin que produzcan

daños sistémicos no deseados. El hígado es considerado el principal órgano metabólico del cuerpo porque recibe cualquier compuesto que se ingiera metabolizándolo y distribuyéndolo al cuerpo. Sin embargo existe una enorme diversidad de fármacos y productos químicos capaces de generar daño hepático (Troncoso y Guija 2007) además del daño ocasionado por agentes infecciosos, alteraciones del flujo biliar, alteraciones metabólicas, congénitas o autoinmunes (Tortora y Grabowski 2002).

El presente trabajo se enfocó en determinar la citotoxicidad de los extractos crudos de *P. marginatus* en contra de la línea tumoral murina L5178Y-R por medio de la técnica colorimétrica de la reducción de la sal de tetrazolio, también conocida como MTT. Además se evaluó la toxicidad ante células del sistema inmune *in vitro*, así como la actividad metabólica del hígado y la actividad antitumoral de los extractos más activos *in vivo*.

2. ANTECEDENTES.

Plantas medicinales

Se puede afirmar que el uso de plantas medicinales nació casi con el hombre. Desde los tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX, el hombre experimentaba a base de ensayo y error con productos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades y la de sus animales, así como mejorar también su estado de ánimo. Esta práctica pasaba y se perfeccionaba de generación en generación (Fonnegra 2007).

Alrededor del mundo en las diferentes culturas existen Códices en los cuales documentan las propiedades medicinales de las plantas, su uso y forma de aplicación. En México, existe el “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” escrito por Martín de la Cruz en 1552 y traducido al latín por Juan Badiano; este es el primer documento en donde se representan plantas mexicanas, es decir, se trata de la fuente más antigua donde los botánicos pueden encontrar figuras de plantas autóctonas (Valdés-Gutiérrez *et. al.* 1992).

Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las más complejas herbolarias del mundo, esto debido a su gran riqueza cultural y étnica que alcanzaron. Y es así como desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado las plantas con alguna finalidad médica.

En México cerca de 4,000 especies de plantas con flores presentan alguna propiedad medicinal y se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que presentan se ha llevado a cabo en solo 5% de las especies (Ocegueda *et. al.* 2005).

Las plantas medicinales por definición son todas aquellas que en cualquiera de sus partes (raíz, tallo, hoja, fruta, semilla y flor) posee compuestos activos que a concentraciones suficientes producen efectos curativos en contra de enfermedades del hombre o animales. (Cañigueral *et. al.* 2003).

En México una de las principales causas de muerte además de la diabetes es el cáncer, y desde el 2006 el cáncer de mama es la principal causa de muerte entre las mujeres mientras que el cáncer de próstata es el más común entre los hombres (Caballero-Hernandez *et al.* 2014). Si bien la industria farmacéutica ha logrado grandes avances en tratamientos más eficaces, estos no siempre se encuentran disponibles para todo el público, sin embargo los tratamientos de primera línea siguen siendo radioterapia y quimioterapia, los cuales tienen los inconvenientes de disminuir significativamente la calidad de vida del paciente y de tener un alto costo económico.

Es de suma importancia el estudiar las propiedades terapéuticas de compuestos naturales obtenidas de plantas nativas, para proporcionar un sustento científico y racional al uso popular de las mismas (Gomez-Flores *et al.* 2009), además de aislar principios activos patentables y ampliar así las posibilidades para el tratamiento del cáncer (Figura 1) y otras enfermedades infecciosas, en particular si consideramos la resistencia a los fármacos ya existentes.



Figura 1. *Catharanthus roseus*. Planta de la cual se obtuvieron la vincristina y vinblastina, dos compuestos con actividad antitumoral.

Aspectos generales de la familia Cactaceae.

La familia *Cactaceae* es un grupo de plantas que comprende 1500 especies (Hunt 1999). Están distribuidas desde Peace River en British Columbia y Alberta, Canadá, a 56°15' de latitud norte, hasta la Patagonia en Argentina a 52° de latitud sur, y desde el nivel de mar en las dunas costeras, hasta 5100m de elevación en Perú (Bravo-Hollis y Scheinvar 1995). Las cactáceas se distribuyen en una gran diversidad de biomasa, desde selvas tropicales lluviosas hasta desiertos extremadamente áridos (Figura 2).



Figura 2. Distribución del hábitat de los cactus en el continente Americano. Imagen de <http://cactiguide.com/places/>

Un grupo que se distingue por incluir a las mayores tallas, son las cactáceas columnares. Todas las cactáceas columnares pertenecen a la subfamilia *Cactoideae* (Anderson *et al.* 2001). En México existen aproximadamente 70 especies de cactáceas columnares, de las cuales 45 se encuentran en la vertiente del Pacífico Sur, que comprende el Valle de Tehuacán y la depresión de Balsas (Valiente-Banuet *et al.* 1996).

Las cactáceas columnares se encuentran entre las especies más importantes de las comunidades de los desiertos cálidos de Norte América, de las comunidades áridas del Caribe y América del Sur, y de las montañas secas de América del Sur. Están también presentes en islas oceánicas donde muestran un alto grado de endemismo, tal es el caso de las especies del archipiélago de las Galápagos.

Las cactáceas columnares proveen de recursos alimenticios a grandes poblaciones de murciélagos, aves e insectos que hacen uso del néctar, polen y frutos como alimento. También sirven de refugio a muchos animales que utilizan su sombra y sus ramas. Todas estas interacciones positivas contribuyen al mantenimiento de las especies y promueven la diversidad de estos ecosistemas (Figura 3). Las cactáceas columnares también son importantes en términos económicos y representan una base importante en la cultura de los grupos indígenas del México árido (Bravo-Hollis y Sanchez-Mejorana 1978; Arias *et al.* 2012; Felger y Moser 1991.).



Figura 3. Usos de las cactáceas. Utilizadas como alimento tanto sus cladodios (A) y frutos (B), así como para hábitat de animales (C).

***Pachycereus marginatus* (DC) Britton & Rose**

P. marginatus es comúnmente llamado chilayo, cereus grande y cactus órgano (Figura 4). Cuenta también con sinónimos botánicos dependiendo el autor, como *Cereus marginatus* DC; *Lemaireocereus marginatus* (DC.) Berger y *Marginatocereus marginatus* (DC.) Backeberg (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *P. marginatus*

| | |
|------------|-----------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Subreino | <i>Tracheobionta</i> |
| División | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Subclase | <i>Caryophyllidae</i> |
| Orden | <i>Caryophyllales</i> |
| Familia | <i>Cactaceae</i> |
| Subfamilia | <i>Cactoideae</i> |
| Tribu | <i>Pachycereeae</i> |
| Género | <i>Pachycereus</i> |
| Especie | <i>marginatus</i> |

Botánica de *P. marginatus*

Es una especie fanerógama perteneciente a la familia de las *Cactaceae*. Es un cactus columnar que se ramifica desde la base, hasta 8m de altura, de color verde oscuro, 4 a 7 costillas elevadas anchas con arista delgada. Posee areolas grandes alargadas próximas entre sí confluentes y con fieltro grisáceo claro, armado de 7 espinas radiales rojizas, con una o dos espinas centrales y con flores de color blanco verdoso o rojizo (Figura 4).

Endémica de los estados de Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla. Es una especie muy común en México ya que es utilizada como cerca viva (Figura 5) y que se ha extendido su uso en todo el mundo.



Figura 4. Flor de *Pachycereus marginatus*



Figura 5. Uso de *P. marginatus* como cerca viva.

Fitoquímica de *P. marginatus*

Hasta la fecha la búsqueda de productos naturales con atributos terapéuticos tiene un gran desarrollo. Para *P. marginatus* no existen reportes sobre su uso en contra de cáncer, pero es recomendado en la medicina tradicional mexicana para tratar la diabetes, esto debido por su alto contenido de fibra y agua. Sin embargo, *P. marginatus* presenta una relación filogenética estrecha con el cactus *L. schottii*, del cual existen referencias bibliográficas sobre la presencia de metabolitos secundarios, así como de su uso empírico. Se ha reportado para *L. schottii*, los triterpenos lupeol y lofenol (Anderson *et al.* 2001; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991), así como los compuestos de pilocereina y lofocina (Wani-Mansukh *et al.* 1980).

Estudios previos.

En estudios previos de *P. marginatus*, se ha observado que posee una relación genética estrecha con el cactus *Lophocereus schottii* del cual, el extracto metanólico de *L. schottii* ha presentado actividad inhibitoria en contra de *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*; también presentó una citotoxicidad contra de la línea celular de cérvix humano HeLa del 50% a una concentración de 73.3µg/mL, mientras que el extracto acuoso fue de 9.2µg/mL (Morales-Rubio *et al.* 2006).

Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, junto con las cardiopatías y la diabetes (Boik 1996; Rath 2001; ACS 2012). En México los principales cánceres son el de mama para mujeres y el de próstata para hombres. Desde una perspectiva inmunológica, las células cancerosas pueden considerarse como células propias alteradas que han escapado a los mecanismos de regulación normal de crecimiento. Estas células dan lugar a clones que

pueden alcanzar un tamaño considerable, produciendo un tumor o neoplasia (Auyang 2010; Goldsby *et al.* 2004).

Terminología de Cáncer

El término cáncer se refiere específicamente a un tumor maligno, que significa un crecimiento progresivo e invasor, que puede presentar una migración a otros tejidos por medio de la sangre o por la linfa (metástasis) (Qian *et al.* 2001).

El cáncer se clasifica según el tipo de tejido; carcinomas (los de origen epitelial que constituyen la mayor parte de los cánceres glandulares, pecho, estómago, útero, piel y lengua, este es el más común, más del 80%), leucemia/linfoma (de origen hematopoyético linfoide, aproximadamente 9%) y sarcoma (los de origen mesenquimatoso, que afectan el tejido óseo y muscular, alrededor 1%) (Goldsby *et al.* 2004).

Los linfomas son neoplasmas de células B y células T, que típicamente resultan en el agrandamiento de los ganglios linfáticos; sin embargo, el páncreas, la médula ósea y otros tejidos también podrían ser infiltrados. Las leucemias, por su parte, son el resultado de células neoplásicas provenientes de linfomas que circulan por la sangre.

Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Entre éstos se encuentran: la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones bacterianas o virales y traumatismos. Los investigadores estudian como estos diferentes factores pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos. El cáncer es, en esencia, un proceso genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas, o producidas en alguna célula por un virus o por una lesión provocada de manera externa (Qian *et al.* 2001).

Linfoma L5178Y-R

La línea celular L5178Y (Figura 6) es un linfoma murino que se obtuvo a partir de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 con 3-metilcolantreno; el tumor se adaptó a una suspensión de células, se ha mantenido por pases *in vivo* en su hospedero singénico (Beer *et al.* 1983). En 1959, Fischer, formuló un medio de cultivo que permitió su cultivo *in vitro*. Esta línea celular se emplea ampliamente para estudios de radiosensibilidad y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que al inocularse vía intramuscular (*im*) en ratones DBA/2 o Balb/c, crece en forma sólida como linfoma. A pesar de la relación hospedero-huésped, se ha encontrado que el linfoma L5178-Y es inmunogénico en ratones DBA/2.

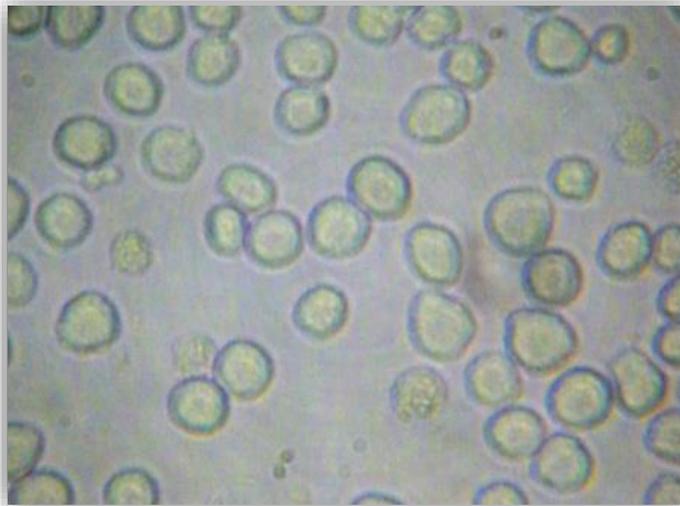


Figura 6. Vista de la línea celular L5178Y-R en cultivo

Tales tumores se presentan generalmente rodeados por una matriz de células huésped-linfoide asociadas y para algún contacto con la vía sanguínea del hospedero que ofrece una importante característica entre la interacción tumor – hospedero.

El uso de un modelo de tumor ascítico como el linfoma L5178-Y también facilita la investigación de un papel posible en el rechazo de los macrófagos en el tumor. La utilización de un tumor en su forma ascítica evita la necrosis de las células del tumor durante el crecimiento temprano, permitiendo así una estimación más exacta del índice del crecimiento del tumor.

Las células de la línea tumoral 5178Y-R que se utilizaron en el presente estudio, eran resistentes a los rayos X, pero sensibles a la radiación ultravioleta, al calor y drogas antineoplásicas (ATCC 2016).

Proliferación Celular Tumoral.

En los órganos y tejidos maduros hay un balance entre la renovación y muerte celular, conforme las células mueren, nuevas células se van generando por procesos de proliferación y diferenciación celular; bajo condiciones normales la producción de nuevas células está regulada de modo que el número de células de cada tipo se mantenga constante (Gavrieli *et al.* 1992). Las células que envejecen o las que ya no son requeridas mueren, mediante un proceso programado de mecanismos celulares y moleculares complejos que recibe el nombre de apoptosis (Zandman-Goddard y Blank 2002; Sanchez-Torres y Diosdado-Vargas 2003). Las células cancerosas presentan un defecto en el proceso de apoptosis. Las vías de la regulación de la apoptosis están controladas por varios factores, entre los que se encuentran estímulos fisiológicos como la presencia de señales de muerte celular dadas por factores de necrosis tumoral (TNF), neurotransmisores, calcio o por falta de factores de crecimiento, y se dirige por un grupo de genes que produce proteínas reguladoras e inhibidoras en cascada. Los genes claves para esta cascada de señales son, los efectores como el p53, c-myc, nur77, erg-1, ICE (subfamilia de enzima caspasa), RP-2, RP-8 que inducen apoptosis cuando se sobre-expresan en varios sistemas celulares; y su contraparte, los inhibidores de muerte celular como el Bcl-2 que regula negativamente la apoptosis mediada por p53 y c-myc; y potenciadores, como Bax y Bcl-xs, que promueven la apoptosis tras unirse al Bcl-2 y suprimir su efecto inhibidor de apoptosis (Boise *et al.* 1993; Oltvai *et al.* 1993; Martin *et al.* 1994).

Toxicología

La toxicología es una ciencia tan antigua como la vida sobre la tierra y existen testimonios del uso de sustancias tóxicas desde el paleolítico hasta la actualidad, así como también hay referencias en las cuales consta el deseo de encontrar los llamados hoy en día, antídotos.

La toxicología se puede definir como la ciencia que estudia los efectos adversos de las sustancias y productos químicos sobre los organismos vivos, así como los mecanismos de acción, diagnóstico, prevención y tratamiento de las intoxicaciones (Klaasen *et al.* 1986; Repetto y Sanz 1993).

Un tóxico sería aquella sustancia capaz de producir en un órgano o sistema lesiones estructurales o funcionales e incluso la muerte. Sin embargo, casi todas las sustancias conocidas pueden ser tóxicas si están presentes en el organismo en una cantidad suficiente para causar el daño. De acuerdo con Paracelso, la dosis correcta es la que diferencia a un veneno de un remedio (Klaasen *et al.* 1986; Astolfi 1988; Hardman *et al.* 1996). No hay sustancias inocuas, sólo hay formas inofensivas de manejarlas (Repetto 1997).

Se han creado grados de toxicidad para minimizar la incertidumbre de que es o no tóxico, estos grados están basados en la dosis letal (DL). La DL es aquella dosis cuya administración causa la muerte; por ejemplo, la DL50 es la dosis que resulta letal para el 50% de los individuos que la reciben (Repetto 1997).

Una clasificación que podemos utilizar a la toxicidad menciona que una dosis menor de 5mg/kg es súper tóxica mientras que una dosis de 15g/kg es prácticamente inocua (Tabla 2) (Klaasen *et al.* 1986).

Tabla 2. Grados de toxicidad para extractos vegetales.

| Rango de toxicidad | Dosis letal probable en humanos |
|-----------------------|---------------------------------|
| No tóxico | 15g/kg |
| Ligeramente tóxico | 5-15g/kg |
| Moderadamente tóxico | 0.5-5g/kg |
| Muy tóxico | 50-500mg/kg |
| Extremadamente tóxico | 5-50mg/kg |
| Súper tóxico | <5mg/kg |

Intoxicación por plantas

En cuestiones de intoxicaciones podemos mencionar que se dividen en dos, las intoxicaciones accidentales y las voluntarias. En las intoxicaciones voluntarias podemos incluir las sociales, el “*doping*” y las suicidas, mientras que en las accidentales abarca una mayor cantidad en las que se encuentran las intoxicaciones con medicamentos, domésticas, profesionales, con plantas, picaduras y mordeduras de animales, entre otras (Figura 7) (Dreisbach 1984; Gonzalez y Recalde 2006).

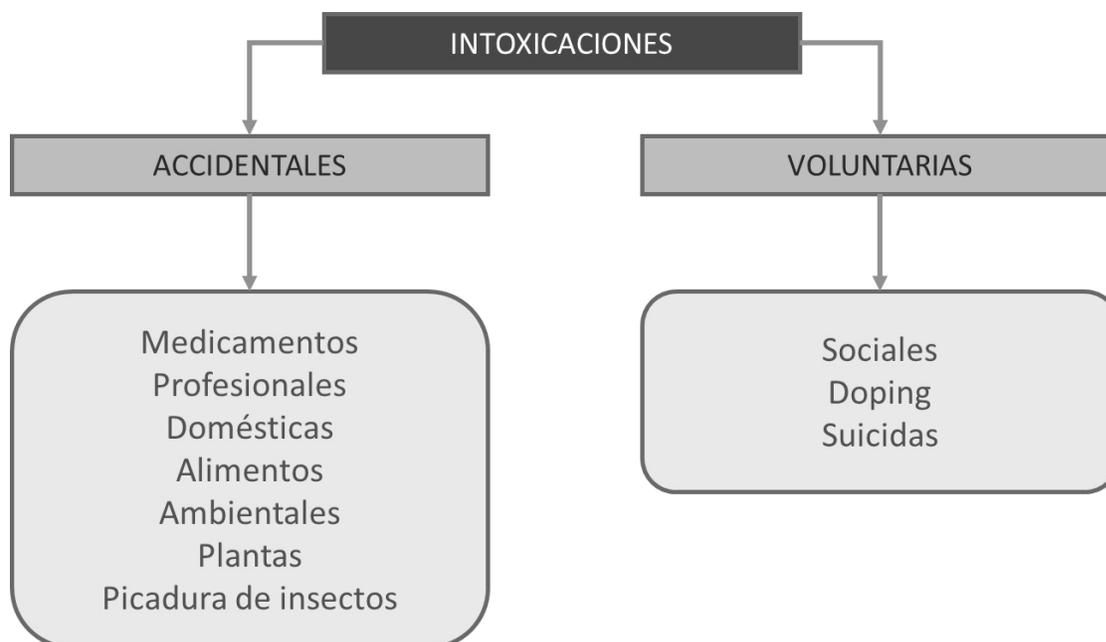


Figura 7. Tipos de intoxicaciones

Las intoxicaciones con plantas se dan tanto en el hombre como en animales (salvajes o domésticos), y esto debido a la ingesta de plantas con toxinas que producen o secretan como metabolito secundario o para defenderse. En el caso de los niños las intoxicaciones se dan por el contacto de plantas tóxicas, mientras que en los adultos es más bien por la ingesta de plantas pensando que estas poseen propiedades medicinales, placenteras o alucinógenas (Dreisbach 1984). Las intoxicaciones más severas se dan en campo, donde las personas consumen las plantas, sin saber que son tóxicas, para su supervivencia (Dreisbach 1984; González y Recalde 2006).

Metabolismo de los fármacos

El hígado es la glándula con mayor peso en el cuerpo, cerca de 1.4 kg en un adulto promedio de talla promedio y ocupa el segundo lugar, después de la piel, como órgano más grande. Se localiza en el plano inferior del diafragma y ocupa gran parte del hipocondrio derecho y una porción del epigastrio, en la cavidad abdomino-pélvica (Figura 8) (Tortora y Grabowski 2002).

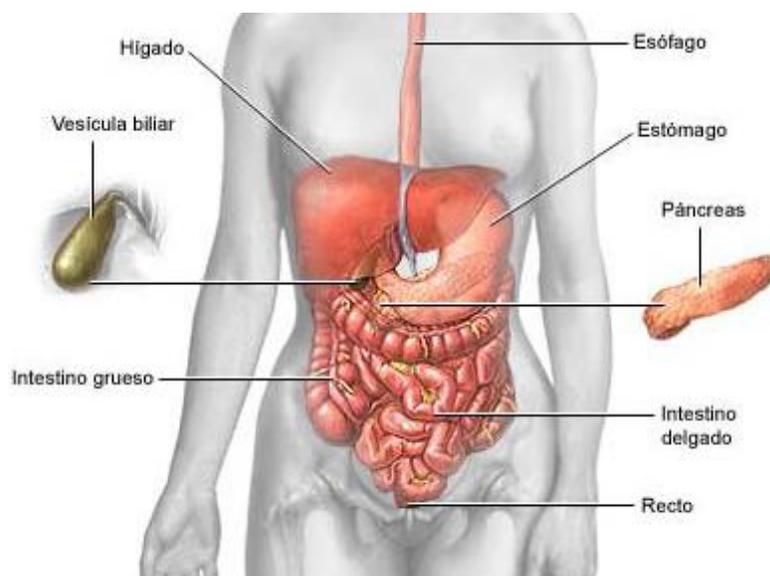


Figura 8. Orientación del hígado en el cuerpo humano

Los lóbulos del hígado se componen de numerosas unidades funcionales, lobulillos, que consisten en células epiteliales especializadas, llamados hepatocitos, dispuestas en láminas ramificantes e irregulares conectadas unas con otras, alrededor de una vena central. En lugar de capilares, el hígado posee grandes espacios epiteliales con revestimiento de endotelio, los sinusoides, por los cuales circula la sangre. Además, contienen fagocitos fijos, las células retículo-endoteliales estrelladas de Kupffer, que se encargan de la destrucción de los leucocitos y eritrocitos viejos, bacterias y otros materiales extraños en la sangre venosa que provienen del tubo digestivo (Tortora y Grabowski 2002).

Funciones del hígado.

Además de secretar bilis, necesaria para la absorción de las grasas alimenticias, el hígado realiza muchas otras funciones vitales, como:

Metabolismo de hidrato de carbono.

Metabolismo de lípidos.

Metabolismo de proteínas.

Excreción de bilirrubina.

Síntesis de sales biliares.

Almacenamiento.

Fagocitosis.

Activación de la vitamina D.

Pero la función de interés en esta investigación es el procesamiento de fármacos, hormonas y otras sustancias, ya que el hígado puede destoxificar sustancias como el etanol o excretar, en la bilis, fármacos como penicilina, eritromicina y sulfamidas. Además modifica químicamente o excreta las hormonas tiroideas y esteroideas, como estrógenos y aldosterona. (Tortora y Grabowski 2002).

Hepatotoxicidad

La hepatotoxicidad (HTX) se define como la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos (Navarro y Senior 2006), por tal motivo es de vital importancia determinar si el extracto y compuestos bioactivos de *P. marginatus* presentan toxicidad hepática *in vivo*.

Existen una enorme diversidad de fármacos y productos químicos capaces de generar daño hepático además del daño ocasionado por agentes infecciosos, alteraciones del flujo biliar, causas metabólicas, congénitas o autoinmunes. El hígado ha sido considerado el principal responsable de la detoxificación de sustancias exógenas, por un lado debido a su estratégica localización lo cual le permite actuar como barrera contra las toxinas ingeridas y por otro lado, ha desarrollado evolutivamente una gran reserva de sistemas enzimáticos que le permite cumplir dicho rol. Sin embargo, es sabido que los productos resultantes de algunos procesos metabólicos derivan en compuestos de mayor toxicidad. Este aspecto es de vital importancia en algunos de los mecanismos de hepatotoxicidad y hepato-carcinogenicidad. Existen algunos compuestos que son eliminados sin ningún tipo de alteración. Sin embargo, la mayoría son eliminados luego de sufrir un proceso de biotransformación que tiene como objetivo principal introducir una serie de modificaciones químicas en la molécula que la transforme de liposoluble en hidrosoluble y de no polar en polar, facilitando de esta manera su excreción no sólo por orina, sino también por bilis y en menor proporción por sudor y saliva. Por otro lado, los compuestos exógenos no polares o insolubles en agua tienden a acumularse por lo que es necesario convertirlos en productos polares para ser eliminados. Lo mismo ocurre con los metabolitos endógenos, por ejemplo del hemo (bilirrubina) y las hormonas (esteroides). Las enzimas que intervienen en los procesos de biotransformación se encuentran en diversos compartimientos subcelulares. Estos sistemas enzimáticos, si bien son más abundantes en el hígado, también se encuentran en el tubo digestivo, la microflora intestinal, los pulmones, la piel, los riñones y la mucosa nasal.

De acuerdo a la fuente de exposición, los agentes hepatotóxicos pueden ser clasificados en naturales o sintéticos, siendo la gran mayoría de origen sintético. Los agentes hepatotóxicos

provenientes de fuentes naturales son los metales o metaloides presentes en la naturaleza y las toxinas producidas por plantas, hongos o bacterias. Los agentes provenientes de fuentes sintéticas son principalmente los producidos por la industria química y farmacéutica. A su vez, dentro de los agentes de origen sintético se pueden incluir los subproductos o materiales de desecho de la industria, además de los productos medicinales, no-medicinales y las drogas de abuso.

La hepatotoxicidad relacionada con drogas se encuentra pobremente documentada posiblemente por la dificultad de establecer un diagnóstico definitivo. La incidencia global de hepatotoxicidad es baja y si bien es difícil de estimar, se calcula entre 1 de cada 10.000 a 1 cada 100.000 pacientes según un estudio francés (Sgro *et al.* 2002). Sin embargo, su impacto es significativo pese a la baja incidencia, dado que la hepatotoxicidad por drogas es la primera causa de insuficiencia hepática fulminante en los EEUU alcanzando del 20% al 40% del total de las causas, siendo el paracetamol la droga más frecuentemente implicada (Larrey 2002). Existen más de 900 medicamentos, así como plantas medicinales, que se han notificado capaces de producir una enfermedad hepática inducida por drogas (Lee 2003). Las drogas más frecuentemente implicadas en el desarrollo de hepatotoxicidad son los antibióticos, antituberculosos, anticonvulsivantes, hipolipemiantes orales y anti-inflamatorios no esteroides (diclofenaco) y en adolescentes, las causas más importantes son el consumo de cocaína, éxtasis e isotretinoína (Sierra y Torres, 2004).

Las reacciones adversas que afectan al hígado son más difíciles de definir, por lo que dicho concepto ha sido establecido por reuniones de consenso que incluye al menos una de las siguientes alteraciones de los análisis bioquímicos hepáticos: aumento de la alanina aminotransferasa (TGP o ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa Alcalina (FA), la concentración total de bilirrubina y bilirrubina directa, siempre que cualquiera de ellos supere por más de dos veces el límite superior de la normalidad (Benichou 1990).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el problema se agrava debido a la resistencia farmacológica adquirida que se ha visto en la práctica médica, existe en la actualidad una marcada tendencia a la investigación y búsqueda de nuevas drogas de origen natural que sean capaces de ayudar a eliminar los tumores con los mínimos efectos secundarios. Los cactus han mostrado en la medicina tradicional ser una alternativa más para tratar el cáncer (Morales-Rubio *et. al.* 2006; Franco-Molina *et. al.* 2003) y otras enfermedades.

Por los motivos anteriormente expuestos, en esta investigación consideramos relevante la evaluación de la actividad antitumoral, inmunomoduladora y hepatotóxica del cactus *P. marginatus*, la cual se encuentra distribuido en México y ha sido usado por la medicina tradicional en algunos padecimientos, lo que nos permitirá evaluar y validar científicamente su uso.

4. HIPÓTESIS

Los extractos crudos de *P. marginatus* presentan actividad citotóxica contra células tumorales sin presentar toxicidad en células hepáticas e inmunológicas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antitumoral, inmunomoduladora y hepatotóxica de los extractos crudos de *P. marginatus* en un modelo murino.

Objetivos particulares.

1. Determinar la actividad citotóxica de los extractos del cactus *P. marginatus in vitro* en contra de la línea tumoral L5178Y-R.
2. Evaluar la actividad inmunomoduladora del extracto del cactus *P. marginatus in vitro*.
3. Determinar la hepatotoxicidad de los extractos de *P. marginatus* en metabolismo de ratón *ex vivo*.
4. Evaluar la actividad antitumoral y hepatotóxica *in vivo* de los extractos de *P. marginatus*
5. Medir la actividad antioxidante de los extractos de *P. marginatus in vitro*.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Se muestra la estrategia experimental llevada a cabo en la siguiente investigación (Figura 9).

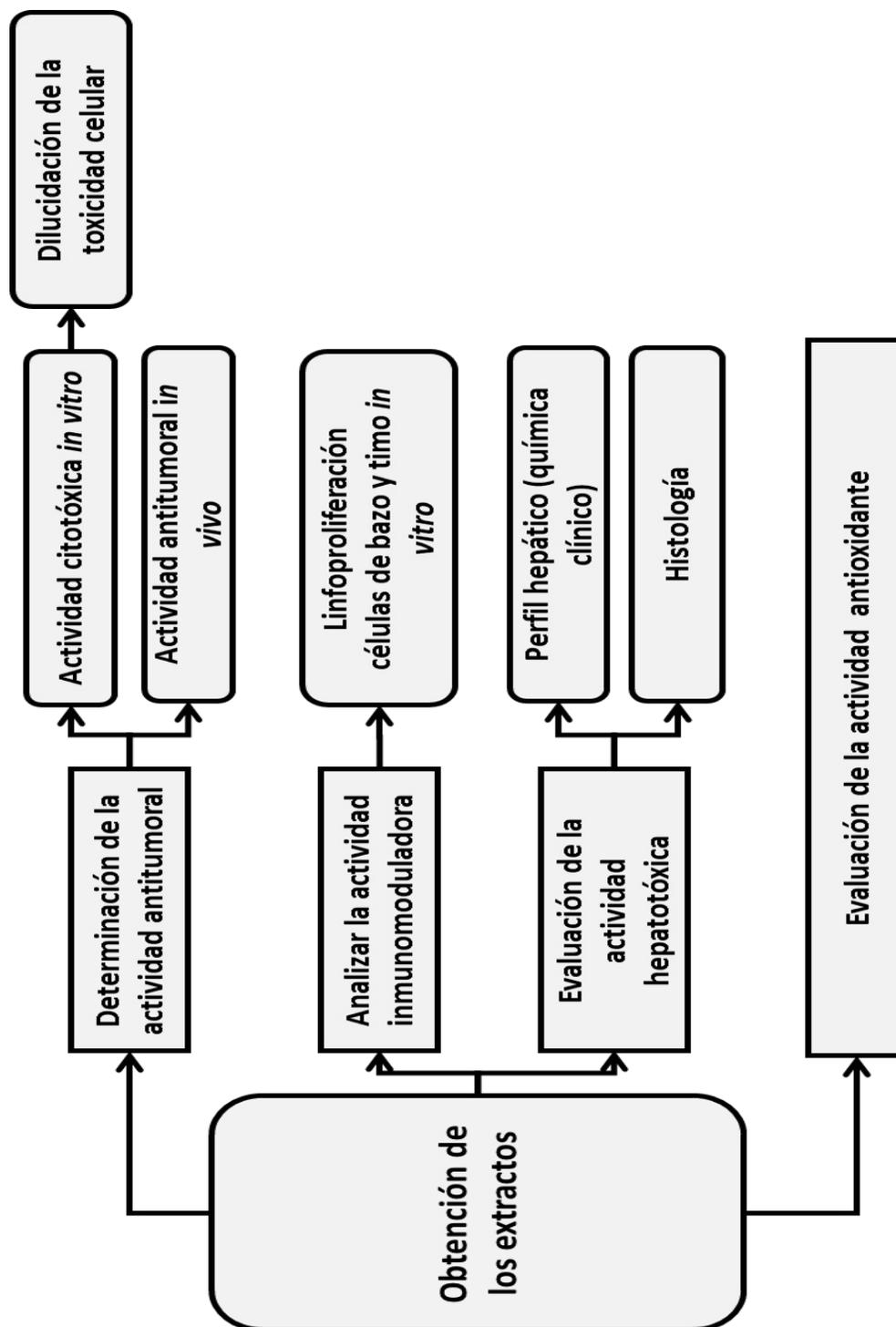


Figura 9. Estrategia de experimentación.

Reactivos y medios de cultivo. La solución de penicilina-estreptomicina, L-glutamina, fungizona y medio RPMI-1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El suero fetal bovino (SFB), metanol, solución amortiguadora (buffer) de lisis para eritrocitos, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), gentamicina, buffer fosfato salino (PBS) y filtros millipore de 0.22 μ m se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los kits de reactivos se compraron en Roche (Mannheim, Germany).

Animales de experimentación. Se utilizaron ratones hembras Balb/c (H-2^d) (Harlan Sprague Dawley Inc., Indianápolis, IN) de 4-6 semanas de edad; se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24°C, bajo un ciclo de luz-oscuridad (fase lumínica 07:00-19:00 h), se les proporciono agua y alimento *ad libitum*. (Figura 10).



Figura 10. Alimentación e hidratación a ratones de laboratorio

Purificación de compuestos. La extracción de los compuestos se realizó en el laboratorio de Fitoquímica a cargo del Dr. Ramiro Quintanilla Licea por medio del método Soxhlet (Quintanilla-Licea *et al.* 2012).

Material vegetal. En el presente estudio se utilizó la parte interna del cactus *P. marginatus* que fue identificado por el Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL. El cactus fue lavado, para eliminar los restos de insectos y polvo, y secadas al sol por una semana para su posterior pulverización con ayuda de un molino manual (Gomez-Flores, *et al.* 2010).

Extractos crudos de P. marginatus. La extracción del material vegetal se realizó en el laboratorio de Fitoquímica por medio del método Soxhlet, en el cual se utilizaron 230 g del cactus seco (previamente pulverizado) y se colocaron en un cartucho de celulosa Whatman 33 X 80 mm, que fue sometido a la extracción Soxhlet.

Extracción Soxhlet. Este método de extracción líquido-sólido se eligió ya que es muy eficaz para pasar el solvente puro continuamente por el material sólido. La extracción es muy práctica ya que se recupera la mayor parte de los productos naturales contenidos en el material vegetal. En el presente trabajo se utilizaron 600 mL de solvente en polaridad creciente para cada cartucho (hexano, cloroformo, metanol) en un matraz redondo para comenzar la extracción que tuvo una duración de 40h por solvente.

Evaporación con Rotavapor. Este proceso se basa en separar el solvente de los extractos mediante un sistema de vacío por medio de una bomba mecánica. Este tiene que estar conectado a un condensador, el vacío está controlado por un manóstato y un manómetro. Este aparato cuenta con un sistema de rotación y un baño calentador donde se calienta el extracto para la evaporación del solvente y luego su condensación. Este condensado cae en otro matraz donde es separado, quedando en el matraz original el extracto de forma sólida. El rotavapor utilizado fue Rotavapor Büchi R – 205 (Buchi Labortechnik AG, Schwitterland).

Preparación de los tratamientos a partir de los extractos crudos. Cada extracto se procedió a tomar la cantidad necesaria para preparar un stock de 1 mg/ml.

Línea celular. La línea tumoral L5178Y se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC), la cual muestra las siguientes características.

| | |
|------------------------|---|
| <i>Morfología</i> | Células tipo linfoide |
| <i>Tejido</i> | Linfoide |
| <i>Origen</i> | Timo de ratón de DBA/2 |
| <i>Crecimiento</i> | Suspensión |
| <i>Procedencia</i> | ATCC |
| <i>Características</i> | Leucemia murina originada a partir de ratón DBA/2 tratado en el timo con metilcolantreno, se deriva la línea celular L5178Y, resistente a rayos X y altamente tumorigénica. |
| <i>Aplicaciones</i> | Análisis de citotoxicidad y de radiación |
| <i>Referencias</i> | Beer <i>et al.</i> 1983. |

Mantenimiento in vivo de la línea tumoral L5178Y-R. Para el mantenimiento del linfoma *in vivo* se utilizaron ratones hembras Balb/c, que se inoculó vía intraperitoneal (*ip*) en la parte media de la región ventral-abdominal con la suspensión (200µL) de la línea tumoral L5178Y-R, a una concentración de 1×10^7 células/mL en buffer de fosfatos salino (PBS). De doce a quince días posteriores a la inoculación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el líquido ascítico y se colectó en tubos cónicos de 50 mL con tapón de rosca (Corning, New York, NY, USA) en 10 mL de PBS a pH 7.2 (durante la recolección de las células se mantuvo en frío el líquido peritoneal para mantener la viabilidad celular). Las células se lavaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 10 mL de PBS (Gomes-Flores *et al.* 2009). Después se realizó la cuenta con azul tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y ajuste celular para el inoculo nuevo en el ratón (Figura 11).



Figura 11. Inoculación intraperitoneal de células tumorales

Mantenimiento in vitro de la línea tumoral L5178Y-R. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamina (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) y antibióticos (0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de fungizona; Sigma-Aldrich). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frascos de 25 cm³ (Corning, New York, NY, USA). Se revisaron periódicamente.

Congelación de las líneas celulares. Para asegurar la disponibilidad de las líneas celulares en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2x10⁷ células/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio de cultivo, 20% suero fetal bovino (SFB) y 10% DMSO como amortiguador de congelamiento que impidió la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispensaron 1mL por criotubo (Corning); este material se almacenó a -70°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que se requirió.

Descongelación de las líneas celulares. Se descongeló el criotubo rápidamente y una vez descongelado, el volumen de células se transfirió a un tubo con 5 mL de medio de cultivo

RPMI frío y se centrifugó por 5 min a 1800 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 10% SFB previamente aatemperado a 37°C en un frasco de 25 cm³ y se incubó a 37°C atmósfera húmeda con 5% CO₂.

Determinación de la viabilidad celular. Se determinó por medio de la exclusión de azul tripan la viabilidad celular previo a cada experimento, la cual fue superior al 95% para el uso en los bioensayos.

Actividad citotóxica in vitro de los extractos crudos de P. marginatus en contra del linfoma murino L5178Y-R. Se utilizó la técnica colorimétrica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio), que nos brindó la posibilidad de cuantificar la citotoxicidad del extracto por medio de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y de vesículas perinucleares de las células vivas de la línea tumoral a diferentes concentraciones, el cual reduce el MTT a cristales de formazán que pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células metabólicamente activas (Mosmann 1983). Para esto, se tomó una alícuota del cultivo celular y se lavó una vez con RPMI-1640 por medio de centrifugación a 1800 rpm por 10 min; posteriormente se resuspendió en medio RPMI completo y se ajustó a 5×10^4 células/mL. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (Corning, New York, USA), conteniendo los cultivos por triplicado en alícuotas de 100µL donde previamente se colocaron 100µL del tratamiento a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1:2 partiendo de 250µg/mL, 100µL del antineoplásico vincristina (100µg/mL) como control positivo y 100µL de medio de cultivo como control no tratado; posterior a esto se incubaron los cultivos durante 48h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire. Al finalizar este período de tiempo, se colocaron 15µL de MTT a una concentración final de 0.5mg/mL y se incubó por 3 h adicionales; después se añadieron 80µL de DMSO a todos los pozos y se le determinó la densidad óptica en el lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) a 570 nm (Figura 12).

El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{A_{570} \text{ de células tratadas con extracto}}{A_{570} \text{ de células no tratadas}} \times 100$$

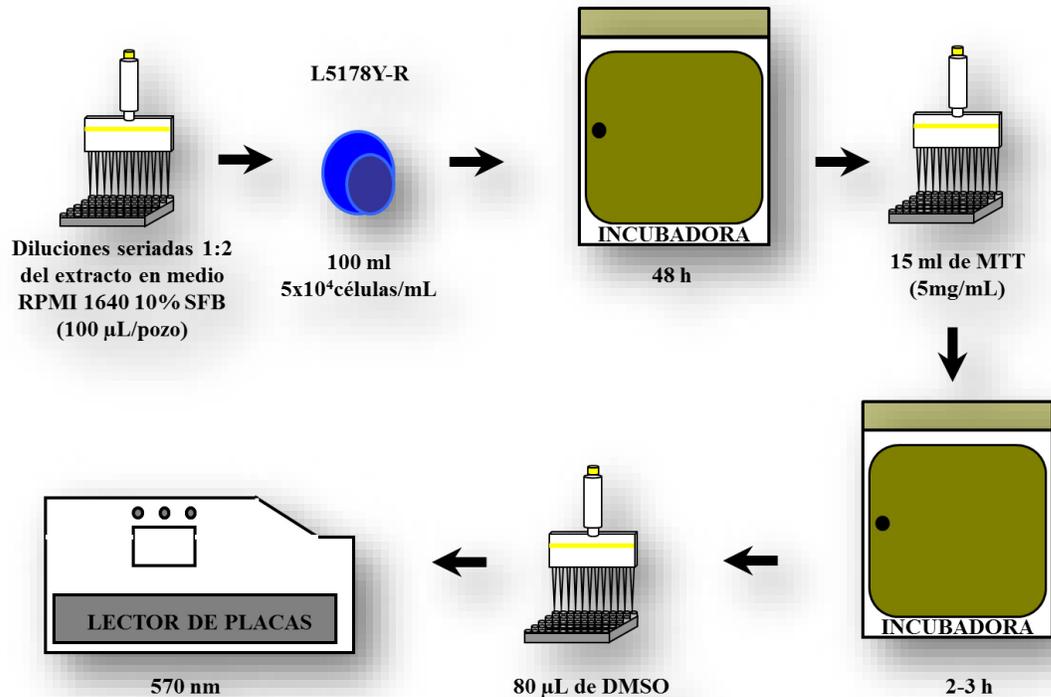


Figura 12. Protocolo de ensayo de citotoxicidad *in vitro* contra células del linfoma murino.

Análisis de fragmentación del ADN

Extracción de ADN. Las células se incubaron 48 h con los extractos crudos y con los respectivos controles negativo (medio de cultivo), positivo (Actinomicina D); finalizado el tiempo de incubación las células se colectaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se lavaron con PBS y la extracción se realizó por medio del kit Wizard Genomic DNA purification® (Promega Corp. USA) de la forma sugerida para células en cultivo.

Detección de fragmentos de ADN. El extracto de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; se utilizó buffer SB para el corrimiento electroforético a 70 V durante 20 min y 110 V durante 40 min. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (5 ng/mL) y las fotos se documentaron bajo luz UV (*High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP*).

Obtención de linfocitos de ratón del timo y bazo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente después se obtuvo el timo y/o bazo, los cuales se maceraron con medio RPMI 1640 de forma independiente, obteniéndose una suspensión celular que se lavó por medio de centrifugación a 1800rpm durante 10min a 24°C, dos veces, con medio RPMI 1640 (Figura 13).

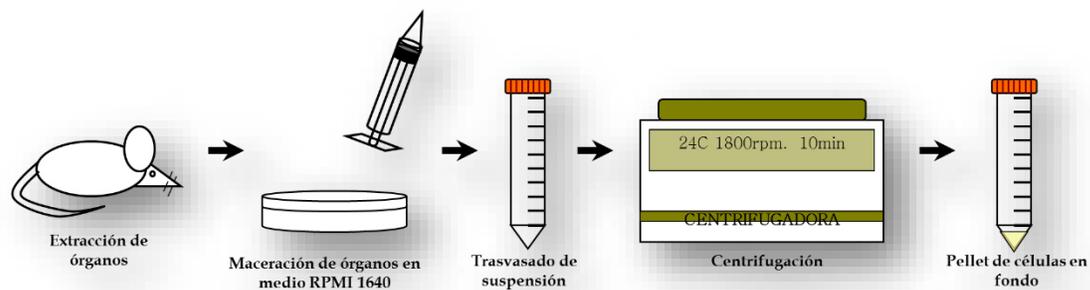


Figura 13. Obtención de suspensiones celulares.

Evaluación de la actividad linfoproliferativa de los extractos de P. marginatus con linfocitos residentes y activados. Para la evaluación de la proliferación de linfocitos el pellet de linfocitos de timo y bazo se disolvió en medio RPMI completo y se ajustaron a 1.25×10^7 y 1×10^7 células/mL respectivamente, se depositaron en alícuotas de 80µL en placas de 96 pozos de fondo plano las cuales previamente se les agregó 100µL del tratamiento ó 100µL de medio RPMI completo (el cual fungió como control) por triplicado; posterior se agregó 20µL del mitógeno Con-A a una concentración óptima de 2.5µg/mL ó 20µL de medio (el cual sirvió como control no estimulado) y se obtuvo un volumen final de 200µL. Se incubó por 44h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire. Posteriormente se adicionó 20µL de MTT a cada pozo a una concentración final de 0.5mg/mL y se incubó el cultivo por 4h, después se

agregaron 80µL de amortiguador de lisis celular (SDS al 20% en 50% de DMF) a todos los pozos y la placa se incubo durante 16h. Después se leyeron las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 570nm en un lector de microplacas (Figura 14).

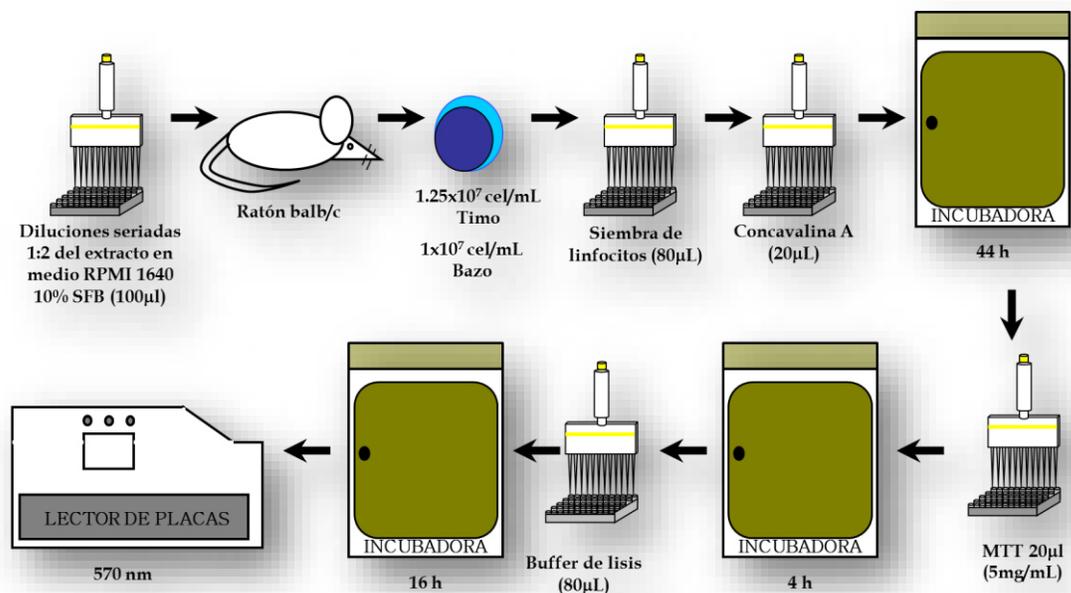


Figura 14. Protocolo de ensayo de linfoproliferación *in vitro* con células de timo y bazo.

Determinación de la actividad antitumoral in vivo. Se utilizó el modelo experimental en ratones Balb/c al cual se le administró el linfoma L5178Y-R, previamente descrito (Gomez-Flores *et al.* 2005). En este modelo se utilizaron ratones hembras Balb/c (H-2^d) de 6-8 semanas de edad que fueron inoculadas vía intramuscular (*im*) sobre el muslo de la extremidad posterior derecha con 5x10⁶ células del linfoma L5178Y-R suspendidas en un volumen de 200 µL de PBS. Después de 7 d (tiempo en el cual se forma un tumor de aproximadamente 100 cm³), se administraron los tratamientos cada tercer día, durante 20 d, sumando un total de 5 inoculaciones (Tabla 3).

| Tabla 3. Grupo de tratamientos para ensayo <i>in vivo</i> | | | |
|---|--------------------------|--|--------------------------|
| Grupo | Tratamiento | Descripción del tratamiento | Dosis |
| I. | Control negativo | Ratones con crecimiento tumoral sin tratar | ----- |
| II. | Extracto crudo <i>im</i> | Se inoculó vía <i>iv</i> en la vena caudal, el compuesto a una concentración de 5mg/Kg disuelto en el vehículo. | Cada 3 ^{er} día |
| III. | Control positivo | Se inoculó vía <i>iv</i> en la vena caudal, el compuesto antineoplásico vicristina (Vintec®) a una concentración de 0.05 mg/Kg | Cada 3 ^{er} día |
| IV. | Control sin tumor | Ratones sin tratar y sin crecimiento tumoral | |

Las medidas del volumen tumoral y peso se empezaron a registrar después de siete días de la inoculación del tumor, en un esquema de veinte días con frecuencia de cada tercer día. El volumen tumoral se estimó midiendo largo y ancho (mm) del tumor con la ayuda de un vernier digital (Mitutoyo Absolute digimatic, Japón); el volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula:

$$Volumen\ tumoral = \frac{largo \times ancho^2}{2}$$

La sobrevivencia entre los 20-60 d se monitoreó diariamente, y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\# \text{ de ratones sobrevivientes} \times 100\%}{\text{No total de ratones}}$$

Prueba de hepatotoxicidad in vivo. Se analizó la toxicología *in vivo* por medio de histopatología y el análisis de la función hepática. Para lograrlo, a los ratones se administraron 200µl del extracto a una concentración de 0.5mg/mL por vía oral, después de 10 días se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvo el plasma que se utilizó para la determinación de la función hepática. Para esto, se determinó la actividad o niveles en plasma de transaminasa glutámica oxalacética, transaminasa glutámica pirúvica, deshidrogenasa de ácido láctico, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, bilirrubina directa e indirecta, albúmina y proteínas totales en el Laboratorio de Análisis Químico Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Actividad hepatotóxica in vivo. Utilizando los ratones de los cuales se determinó la función hepática, se disectaron los hígados y fueron colocados en formaldehído 10% al menos por 48h, después se le realizó la deshidratación del tejido, aclaración y montaje de tejido en portaobjetos. Una vez montados se procedió a la tinción con hematoxilina y eosina (ver anexo para más detalles).

Actividad antioxidante con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil). Para observar la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones activas se realizaron diluciones del extracto a 6.25, 12.5, 25, 50 y 100µg/ml, se tomaron 250µl de estas diluciones y se colocaron en viales de vidrio, se agregaron 750µl de DPPH 0.1 mM, obteniéndose concentraciones finales del extracto a 10, 20, 50 y 100µg/ml, respectivamente. Se incubaron por 30 min en oscuridad y se leyeron las absorbancias a 517nm en un espectrofotómetro (Rodríguez-Garza 2010).

Análisis estadístico. El análisis estadístico consistirá en dos pasos, el primero en la determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el segundo paso, para los datos con una distribución normal predominante se empleó la prueba ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que constaba el experimento (control y tratamientos). En los casos que se encontrara diferencia entre los grupos, se empleó la prueba de *t* de *Student* para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media

entre los tratamientos y del grupo control contra, cada una de las concentraciones de los compuestos (tratamiento).

7. RESULTADOS

Obtención de los extractos crudos de *P. marginatus*

La obtención de los extractos crudos fue realizada por medio de método Soxhlet, del cual se obtuvieron cuatro extractos, los cuales fueron extracto de hexano, cloroformo, metanol y partición acuoso-metanol. De estos extractos se tomaron las cantidades necesarias para tener soluciones de trabajo de 1mg/mL.

Análisis de la actividad citotóxica de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre el crecimiento del linfoma L5178Y-R.

Se evaluaron los extractos para determinar la citotoxicidad de estos en contra de células tumorales L5178Y-R. Utilizando la técnica de MTT, la cual nos brindó la posibilidad de cuantificar de manera indirecta la viabilidad celular en las diluciones seriadas de los extractos crudos.

Mediante el análisis de los resultados se observó que los cuatro extractos mostraron actividad citotóxica contra el linfoma L5178YR, comportándose casi de la misma manera.

El extracto crudo de hexano mostro actividad citotóxica del 20% a la concentración de 1.95µg/mL, dicha actividad aumento a 30% a la concentración de 15.62µg/mL y a 31.25µg/mL la actividad citotóxica fue significativa a 75% ($p<0.01$) y aumento a 85% en las concentraciones de 62.5 ($p<0.01$) y 125µg/mL ($p<0.01$).

El extracto crudo de cloroformo presento una actividad citotóxica de 30% a la concentración de 1.95µg/mL, a la concentración de 3.9µg/mL ($p<0.01$) mostro una citotoxicidad del 80% ($p<0.01$) y esta actividad aumenta a 85% conforme aumenta la concentración a 7.8µg/mL y hasta 125µg/mL ($p<0.01$) se mantiene el porcentaje de citotoxicidad.

El extracto crudo de metanol presento a la concentración de 1.95µg/mL del 30% de actividad citotóxica y aumento a 85% en la concentración de 15.62µg/mL ($p<0.01$) y la actividad se mantiene durante las siguientes concentraciones 31.25, 62.5 y 125µg/mL ($p<0.01$).

La partición acuoso-metanol mostro actividad citotóxica *in vitro* en contra de la línea L5178Y-R de 20% a partir de 1.95µg/mL y aumento a 65% ($p<0.01$) en la concentración de 3.9µg/mL, mientras que a la siguiente concentración 7.81µg/mL la citotoxicidad aumento a 80% ($p<0.01$) siguiendo así hasta la concentración de 125µg/mL ($p<0.01$)(Figura 15).

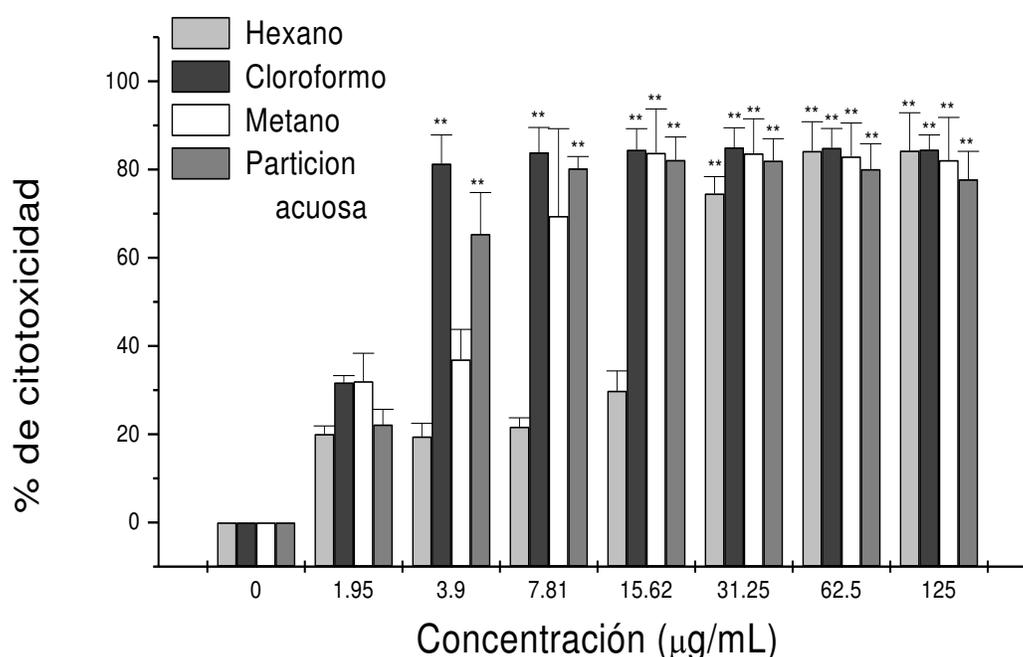


Figura 15. Efecto citotóxico de los extractos crudos de *P. marginatus*, hexánico, cloroformico, metanolico y partición acuoso-metanol, contra la línea linfoide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con las fracciones por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparado con el control sin tratar.

Análisis de la mortalidad celular inducida por los extractos crudos de *P. marginatus*.

Se analizó si la toxicidad los extractos sobre la línea celular inducía la fragmentación de ADN como consecuencia de la muerte celular por medio de la activación de apoptosis de células de linfoma L5178Y-R. Los resultados muestran que a partir de las 6h las células son inducidas a apoptosis ya que por medio del análisis del gel se observan las características bandas de escalera debido a la fragmentación de ADN (Figura 16). El mismo patrón de escalera se observa también en las siguientes horas (Figura 17).

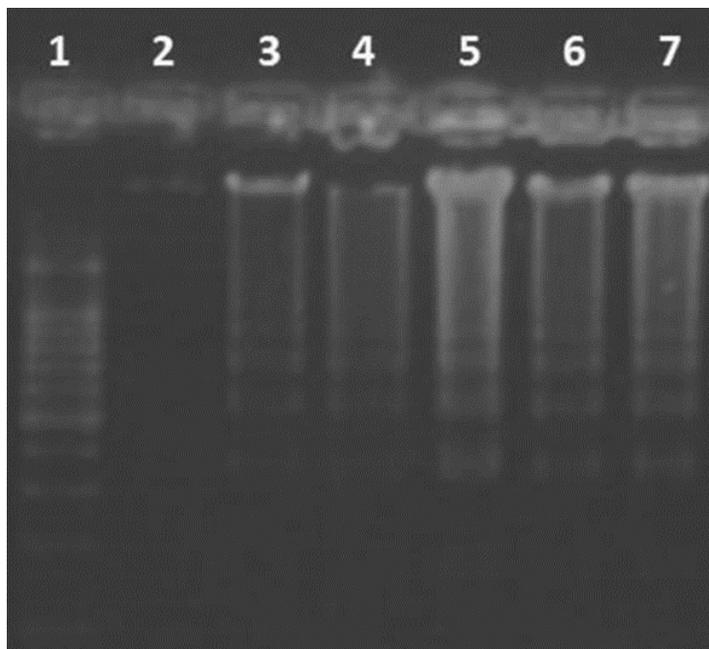


Figura 16. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con los extractos crudos. Patrón característico de la fragmentación de ADN nuclear debido a la muerte celular programada detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% a partir de ADN de células de L5178Y-R tratadas durante 6h en presencia de los extractos, como control positivo se utilizó actinomicina D y como control negativo, el medio de cultivo. Carril 1: Marcador de peso molecular (100pb). Carril 2: Control negativo de células sin tratar. Carril 3: Control positivo para apoptosis con Act D a una concentración de 2.4µg/mL. Carril 4: Células tratadas con extracto crudo de hexano durante 6h. Carril 5: Células tratadas con extracto crudo de cloroformo durante 6h. Carril 6: Células tratadas con extracto crudo de metanol durante 6h Carril 7: Células tratadas con extracto de la particion acuosa-metanol durante 6h

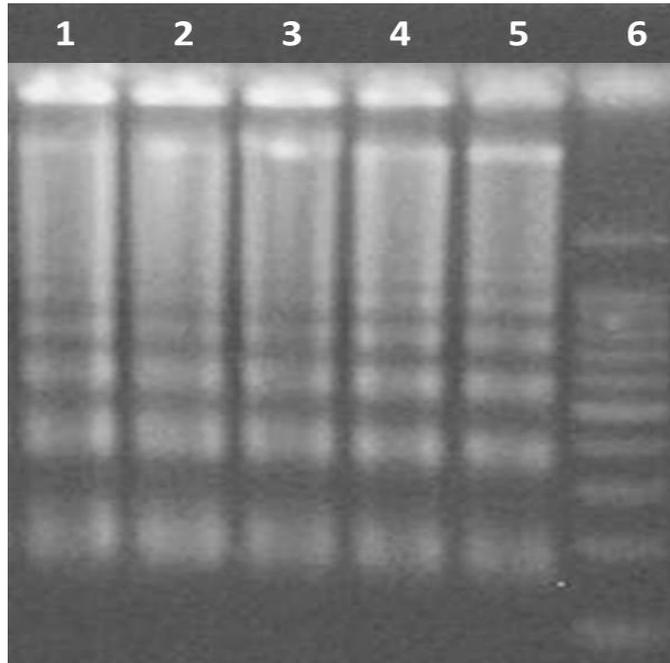


Figura 17. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con los extractos crudos a las 12h. Patrón característico de la fragmentación de ADN nuclear debido a la muerte celular programada detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% a partir de ADN de células de L5178Y-R tratadas durante 12h en presencia de los extractos, como control positivo se utilizó actinomicina D y como control negativo, el medio de cultivo. Carril 1: Control positivo para apoptosis con Act D a una concentración de 2.4 μ g/mL Carril 2: Células tratadas con extracto crudo de hexano durante 6h. Carril 3: Células tratadas con extracto crudo de cloroformo durante 6h. Carril 4: Células tratadas con extracto crudo de metanol durante 6h. Carril 5: Células tratadas con extracto de la particion acuosa-metanol durante 6h. Carril 6: Marcador de peso molecular (100pb).

Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre la proliferación de linfocitos de timo y bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre la proliferación de células de timo y bazo, se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual las células se sometieron a diluciones seriadas del extracto, utilizando un mitógeno estimulante (Con A). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de viabilidad en base a la intensidad en la coloración como respuesta a la respiración celular.

Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos *P. marginatus* sobre la proliferación de linfocitos de timo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Al analizar la actividad de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos de timo, los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con los fracciones en contra los linfocitos de timo en ausencia y presencia del mitógeno (Tabla 4) (Figuras 18 y 19).

Tabla 4. Efecto de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre la proliferación de linfocitos de timo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Con A ($\mu\text{g/mL}$) | Hexano ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | Cloroformo ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | Metanol ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | P. Acuoso- metanol ($\mu\text{g/mL}$) I.P. |
|---------------------------------------|-------------------------------|--|--|---|--|
| 1.5 | ----- | 0.96 \pm 0.01 | 0.96 \pm 0.07 | 0.94 \pm 0.02* | 0.95 \pm 0.04 |
| | 2.4 | 0.94 \pm 0.04 | 0.99 \pm 0.04 | 0.95 \pm 0.03 | 0.95 \pm 0.03 |
| 3.12 | ----- | 0.96 \pm 0.02 | 0.93 \pm 0.08 | 0.94 \pm 0.01* | 0.93 \pm 0.08 |
| | 2.4 | 0.94 \pm 0.06 | 0.95 \pm 0.05 | 0.97 \pm 0.1 | 0.90 \pm 0.08 |
| 6.25 | ----- | 0.99 \pm 0.06 | 0.97 \pm 0.09 | 0.91 \pm 0.01 | 0.93 \pm 0.13 |
| | 2.4 | 0.95 \pm 0.07 | 0.95 \pm 0.05 | 1.22 \pm 0.2 | 0.86 \pm 0.14 |
| 12.5 | ----- | 0.91 \pm 0.07 | 0.98 \pm 0.09 | 0.89 \pm 0.04* | 0.96 \pm 0.04 |
| | 2.4 | 0.89 \pm 0.08 | 0.99 \pm 0.04 | 0.97 \pm 0.03 | 0.88 \pm 0.11 |
| 25 | ----- | 1.00 \pm 0.03 | 0.92 \pm 0.08 | 0.89 \pm 0.02 | 0.89 \pm 0.12 |
| | 2.4 | 1.00 \pm 0.07 | 0.99 \pm 0.07 | 0.92 \pm 0.08 | 0.89 \pm 0.09 |
| 50 | ----- | 1.05 \pm 0.10 | 0.90 \pm 0.05 | 0.92 \pm 0.04 | 0.89 \pm 0.17 |
| | 2.4 | 0.94 \pm 0.05 | 0.94 \pm 0.01* | 0.91 \pm 0.04 | 0.87 \pm 0.09 |
| 100 | ----- | 0.89 \pm 0.05 | 0.92 \pm 0.06 | 0.91 \pm 0.09 | 0.83 \pm 0.02* |
| | 2.4 | 0.86 \pm 0.03* | 0.93 \pm 0.04 | 0.89 \pm 0.02* | 0.86 \pm 0.04* |

La densidad óptica del control no tratado fue de 0.785 \pm 0.029. Los datos representan la media el error estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada experimento.

* p <0.05 comparado con el control sin tratar

I.P. Índice de proliferación

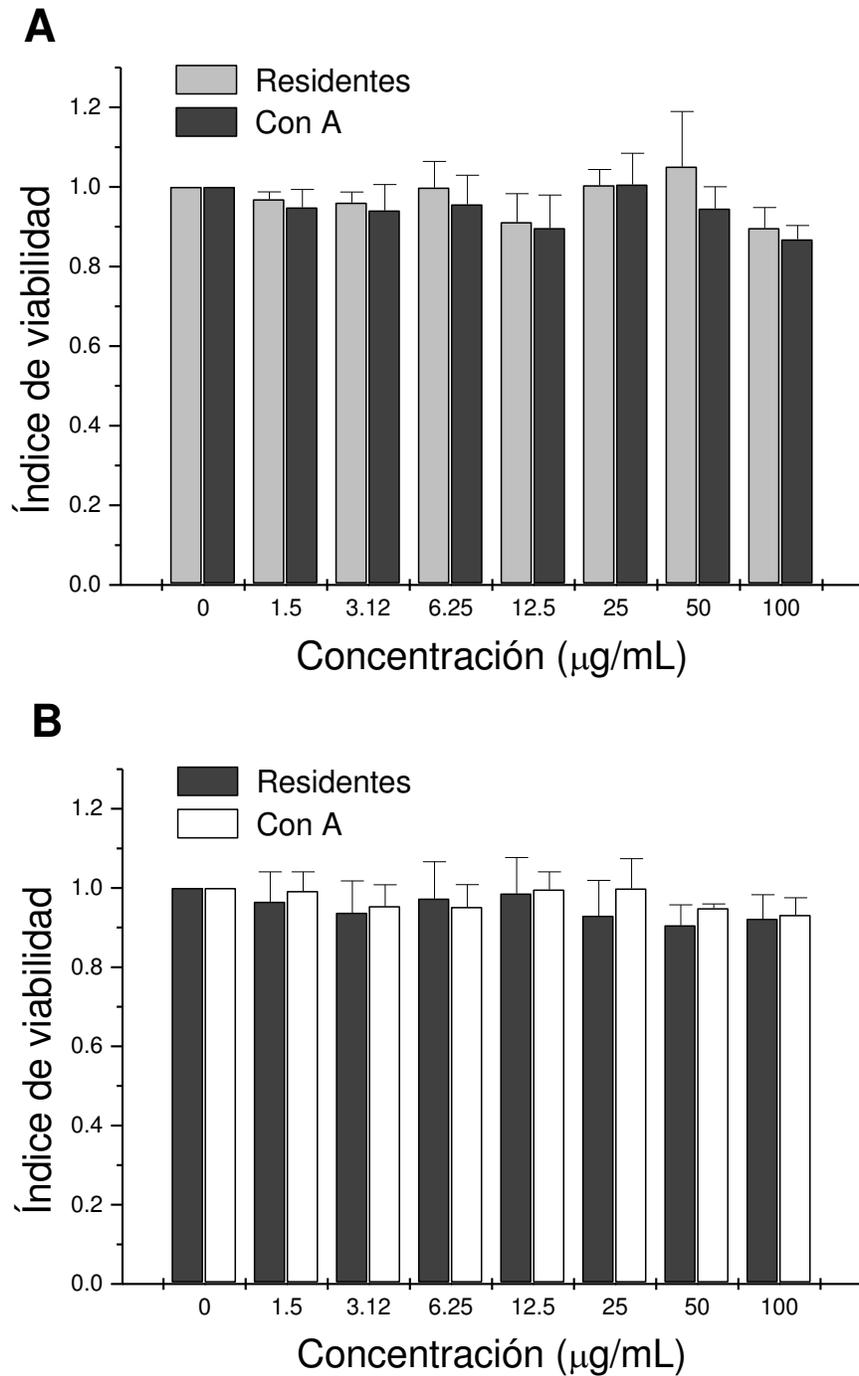


Figura 18. Efecto de los extractos crudo de hexano (A) y cloroformo (B) de *P. marginatus* sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno. El extracto se probó a diferentes concentraciones (1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

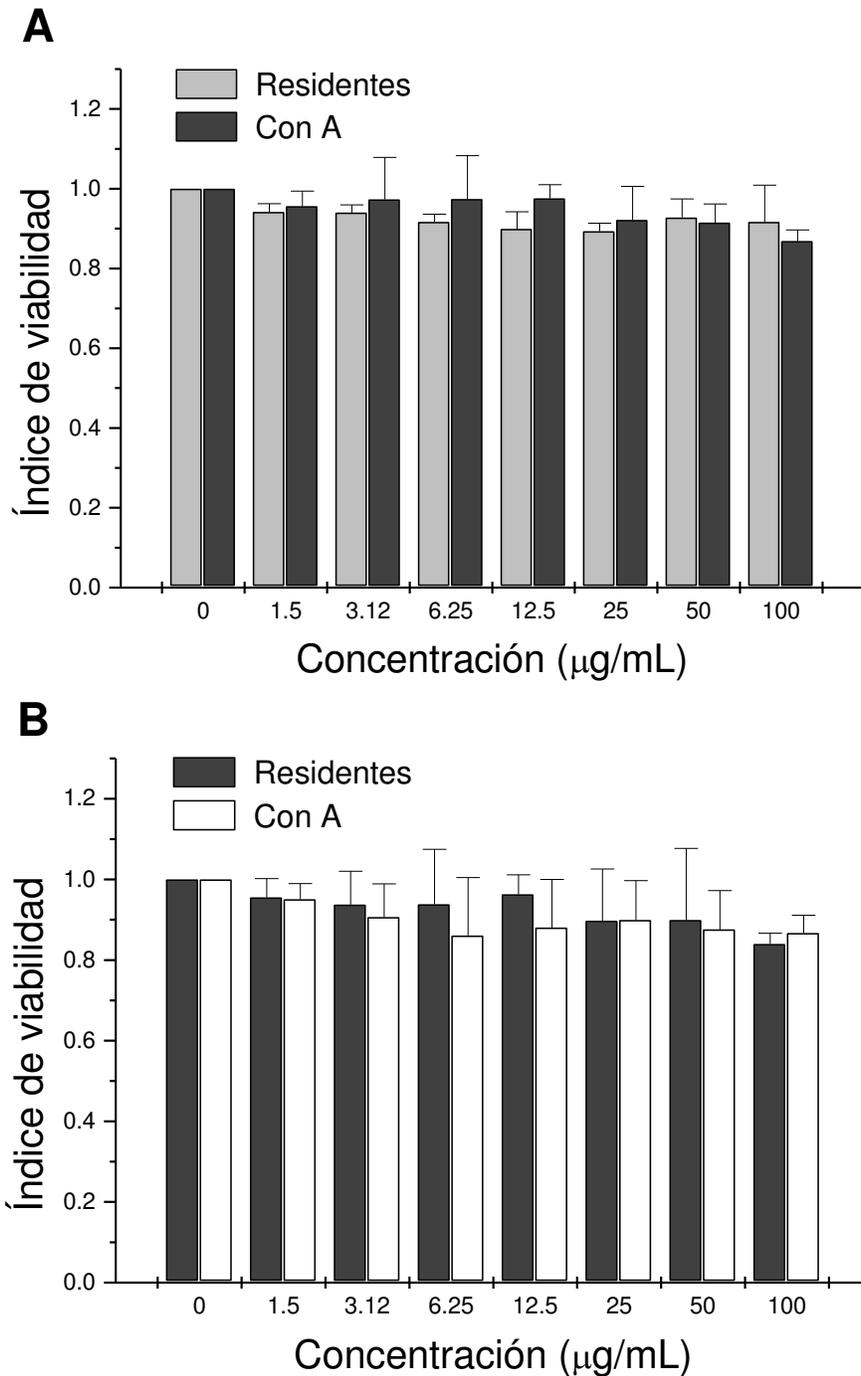


Figura 19. Efecto de los extractos crudo de metanol (A) y la partición acuosa-metanol (B) de *P. marginatus* sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno. El extracto se probó a diferentes concentraciones (1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar. ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

Análisis de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos *P. marginatus* sobre la proliferación de linfocitos de bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Al analizar la actividad de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos de bazo, al igual que los linfocitos de timo los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con los extractos crudos en contra los linfocitos de bazo en ausencia y presencia del mitógeno (Tabla 5) (Figuras 20 y 21).

Tabla 5. Efecto de la actividad inmunomoduladora de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre la proliferación de linfocitos de bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Con A ($\mu\text{g/mL}$) | Hexano ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | Cloroformo ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | Metanol ($\mu\text{g/mL}$) I.P. | P. acuoso- metanol ($\mu\text{g/mL}$) I.P. |
|---------------------------------------|-------------------------------|--|--|---|--|
| 1.5 | ----- | 1.11 \pm 0.11 | 1.08 \pm 0.09 | 1.07 \pm 0.14* | 1.12 \pm 0.15 |
| | 2.4 | 1.13 \pm 0.11 | 1.04 \pm 0.09 | 1.11 \pm 0.14 | 1.08 \pm 0.14 |
| 3.12 | ----- | 1.01 \pm 0.08 | 1.07 \pm 0.10 | 1.08 \pm 0.14 | 1.16 \pm 0.14 |
| | 2.4 | 1.01 \pm 0.05 | 0.98 \pm 0.05 | 1.10 \pm 0.14 | 1.05 \pm 0.13 |
| 6.25 | ----- | 1.06 \pm 0.07 | 1.03 \pm 0.10 | 1.09 \pm 0.14 | 1.16 \pm 0.15 |
| | 2.4 | 1.02 \pm 0.05 | 0.97 \pm 0.05 | 1.08 \pm 0.15 | 1.09 \pm 0.14 |
| 12.5 | ----- | 1.00 \pm 0.09 | 0.95 \pm 0.08 | 1.09 \pm 0.14* | 1.18 \pm 0.14 |
| | 2.4 | 0.94 \pm 0.04 | 0.96 \pm 0.06 | 1.11 \pm 0.15 | 1.08 \pm 0.13 |
| 25 | ----- | 0.94 \pm 0.13* | 0.94 \pm 0.12* | 1.07 \pm 0.13 | 1.08 \pm 0.19 |
| | 2.4 | 0.89 \pm 0.12* | 0.89 \pm 0.12 | 1.10 \pm 0.14 | 0.98 \pm 0.18 |
| 50 | ----- | 0.86 \pm 0.20* | 0.90 \pm 0.22 | 1.08 \pm 0.15* | 1.03 \pm 0.25 |
| | 2.4 | 0.83 \pm 0.20* | 0.89 \pm 0.21 | 1.10 \pm 0.13 | 1.00 \pm 0.23 |
| 100 | ----- | 0.88 \pm 0.25 | 0.88 \pm 0.25 | 0.96 \pm 0.21 | 0.93 \pm 0.23 |
| | 2.4 | 0.87 \pm 0.26 | 0.89 \pm 0.23 | 1.01 \pm 0.25 | 0.96 \pm 0.24 |

La densidad óptica del control no tratado fue de 1.270 \pm 0.033. Los datos representan la media del error estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada experimento.

* p <0.05 comparado con el control sin tratar

I.P. Índice de proliferación

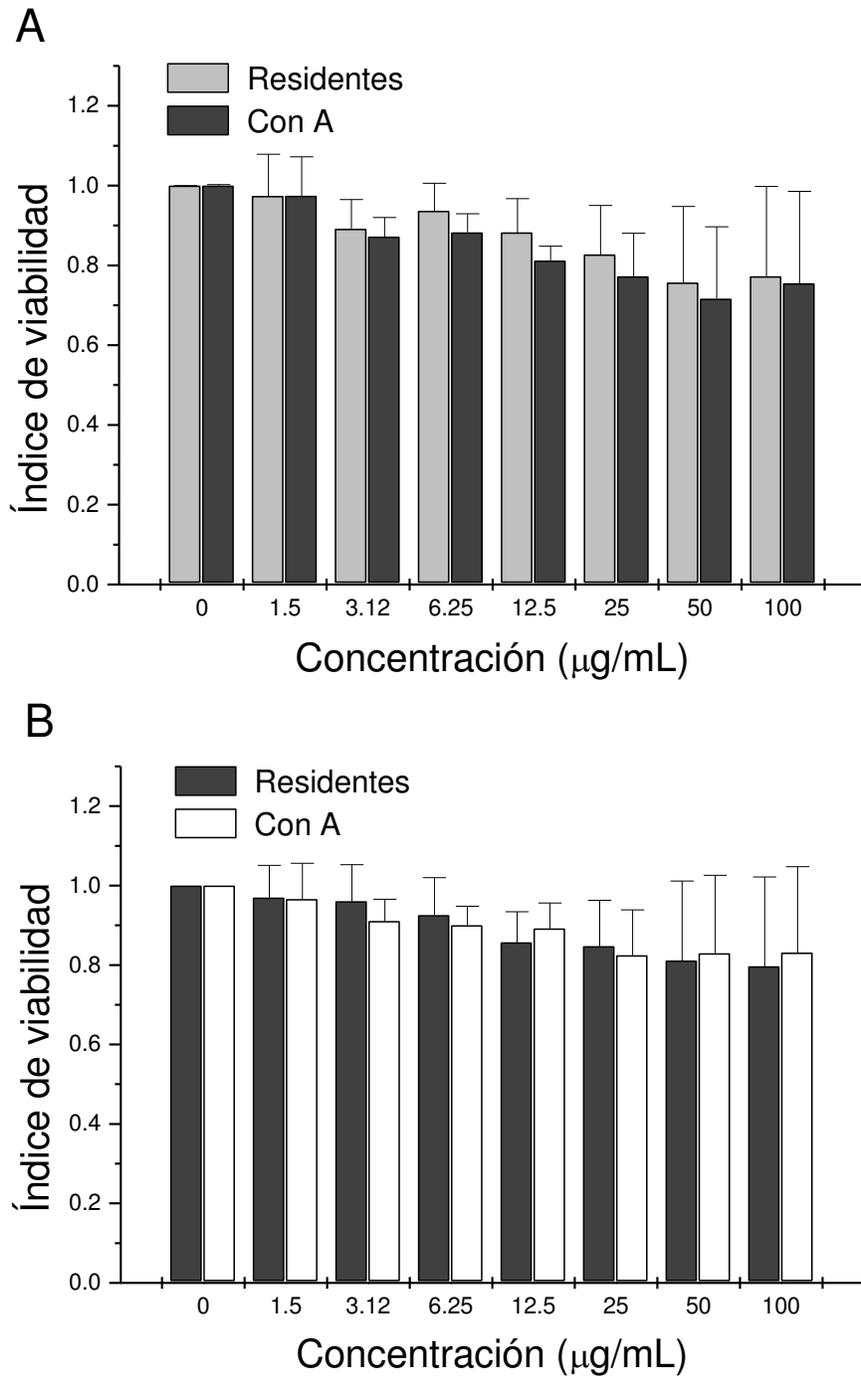


Figura 20. Efecto de los extractos crudo de hexano (A) y cloroformo (B) de *P. marginatus* sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. El extracto se probó a diferentes concentraciones (1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar. ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

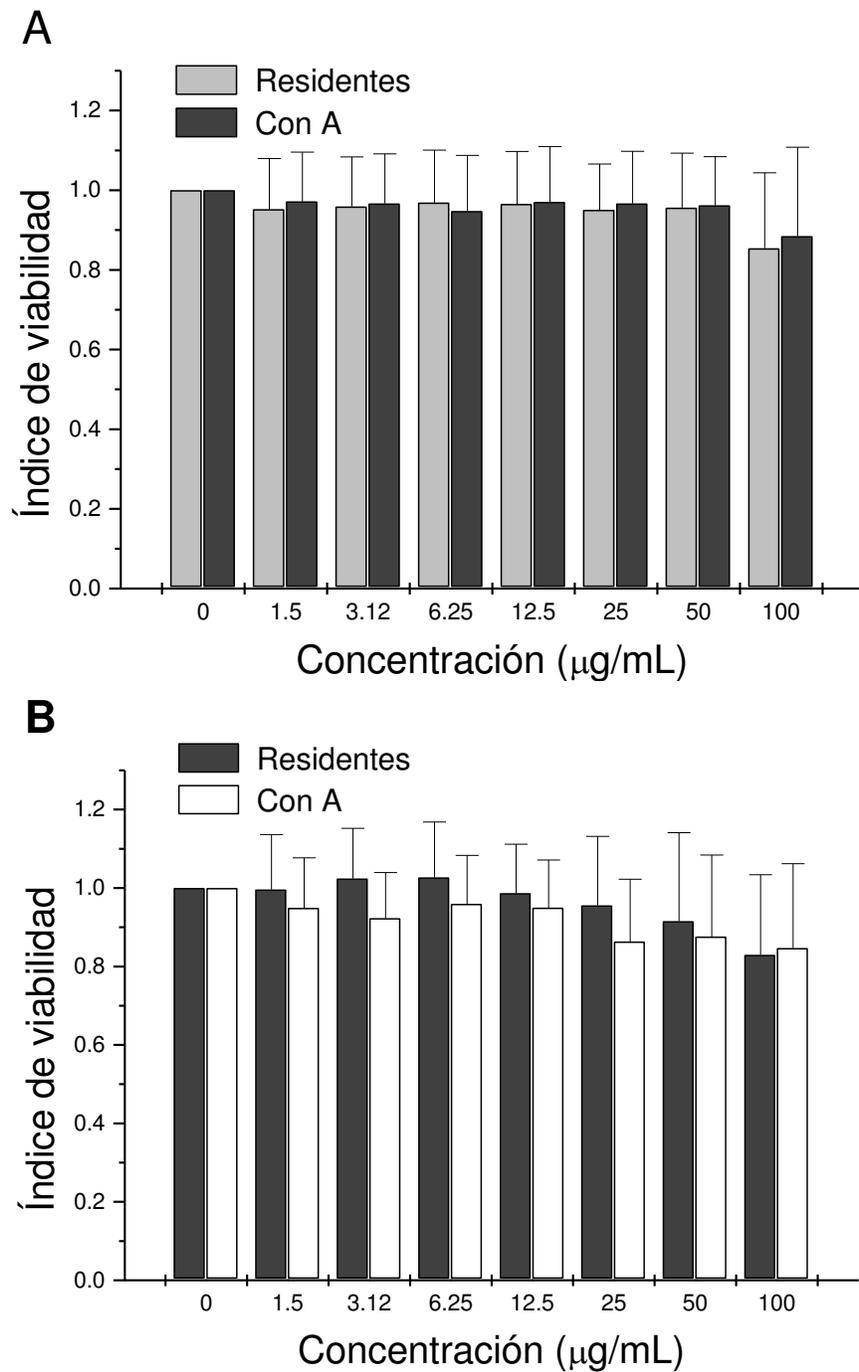


Figura 21. Efecto de los extractos crudo de metanol (A) y la partición acuosa-metanol (B) de *P. marginatus* sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. El extracto se probó a diferentes concentraciones (1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar. ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

Análisis de la actividad antitumoral *in vivo* de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre el linfoma L5178Y-R.

De acuerdo con la actividad observada en los ensayos *in vitro* se seleccionó la partición acuoso-metanol para analizar la actividad antitumoral *in vivo*. Para la evaluación de la actividad se utilizaron 5 ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas por grupo, las cuales se les indujo el tumor y al cabo de una semana de la formación del tumor, se administraron los tratamientos de la manera previamente descrita (sección de material y método).

Efecto de la partición acuoso-metanol sobre el crecimiento tumoral.

De acuerdo al análisis de los resultados, a los 7 días del trasplante del linfoma, se observó que el volumen tumoral, entre los grupos no fue significativamente diferente, así mismo ni el peso previo a la inducción ni el peso pos inducción del tumor fueron diferentes significativamente entre grupos, por lo que indica que los ratones iniciaron el tratamiento en condiciones similares.

El volumen tumoral se analizó utilizando el índice de crecimiento (I.C.) tumoral donde se toma como base el volumen de este de cada grupo en el día posterior al trasplante del tumor, que equivale al día del inicio de los tratamientos (Tabla 6).

Los ratones del grupo I a los cuales solo se les monitoreó su tamaño de pierna donde se les induciría el tumor a los otros grupos, los valores de I.C. tumoral que presentaron fueron de 1, 0.99, 0.99, 1.15 y 1.02 en los días de 7, 10, 13, 17 y 20 respectivamente posteriores al inicio del experimento (Tabla 6).

El grupo II fue tratado con Vincristina a la concentración de 0.05mg/kg, el cual representó al grupo control positivo, los ratones del grupo se trataron con la droga inoculada *via iv*, En este grupo los I.C. fueron de 1, 6.34, 7.54, 8.13 y 7.73 a los días 7, 10, 13, 17 y 20 respectivamente, mostrando una reducción de crecimiento a los 20 días ($p < 0.05$) posteriores al trasplante.

En los ratones del grupo III, que fueron tratado via *im* (0.5mg/kg) con la partición acuoso-metanol, mostraron un índice de crecimiento tumoral de 1, 15.8, 17.3, 18.7, 19.5, 16.9 y 15.7, respectivamente a los días 7, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 posteriores a la inducción del tumor, observando una disminución significativa en los días 24 y 27 de la evaluación (Tabla 6).

Respecto al grupo IV, los ratones fueron inducidos con tumor y no recibieron tratamiento, mostrando I.C. tumorales de 1, 16.0, 20.9, 24.1 y 26.6 en los días 7, 10, 13, 17 y 20 respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre el crecimiento tumoral *in vivo* (volumen tumoral mm³)

| Grupo | E ^a | Día 7c | Día 10 | Día 13 | Día 17 | Día 20 |
|--|-----------------|--------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| I. Control (ratones sanos) | E1 | 233.40 | 252.10 | 272.48 | 248.83 | 213.71 |
| | E2 | 157.70 | 146.41 | 141.45 | 162.74 | 168.94 |
| | E3 | 134.50 | 124.18 | 107.80 | 193.60 | 155.14 |
| | IC ^b | 1.0 | 0.99±0.22** | 0.99±0.28** | 1.15±0.14* | 1.02±0.10* |
| II. Vincristina (0.05mg/kg) | E1 | 337.64 | 726.62 | 741.18 | 865.22 | 931.14 |
| | E2 | 680.73 | 1,070.38 | 1,372.62 | 1,451.54 | 1,254.91 |
| | E3 | 282.52 | 487.51 | 600.01 | 607.98 | 597.92 |
| | IC ^b | 1.0 | 6.34±1.41* | 7.54±1.98** | 8.13±2.08** | 7.73±1.58* |
| III. Acuoso- metanolico (0.5mg/kg) | E1 | 213.60 | 2,322.57 | 2,626.99 | 2,996.92 | 2,571.93 |
| | E2 | 196.35 | 2,531.25 | 3,723.87 | 2,752.99 | 3,142.30 |
| | E3 | 170.33 | 3,088.83 | 2,940.00 | 3,942.72 | 5,404.3 |
| | IC ^b | 1.0 | 15.81±2.61 | 17.36±2.05* | 18.72±2.76 | 19.59±3.68 |
| IV. Ratones con tumor sin tratamiento | E1 | 169.96 | 3,979.53 | 2,549.75 | 2,626.43 | 3,960.57 |
| | E2 | 193.65 | 2,437.50 | 3,389.24 | 4,328.80 | 5,236.04 |
| | E3 | 213.73 | 3,675.82 | 6,273.43 | 5,328.75 | 5,964.37 |
| | IC ^b | 1.0 | 16.05±2.59 | 20.92±4.79 | 24.09±4.66* | 26.61±2.51** |

^a Representan la media del volumen tumoral mm³ de un ensayo con 5 ratones por cada grupo

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al volumen del crecimiento tumoral de cada grupo en el día 7, posterior al trasplante del tumor, que equivale al día de inicio de los tratamientos. Los valores expresados representan la media ± el error estándar de tres experimentos.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ comparado con el control sin tratar.

Efecto de la partición acuoso-metanol sobre la supervivencia de ratones con linfoma

La supervivencia de los ratones se monitoreó diariamente, al menos dos veces por día, durante 60 días.

Entre los ratones del grupo IV, solo ratones con tumor sin tratar, todos murieron en un promedio de 28 días, lo que equivale a un porcentaje de viabilidad del 0% (Figura 22, Tabla 7). Los ratones no mostraron zona de necrosis en el área del linfoma.

La supervivencia del grupo III, tratados con la partición acuoso-metanol, se incrementó significativamente comparado con el control del grupo IV de los ratones con tumor sin tratamiento. Los ratones no mostraron evidencia de algún daño tisular en el área del tumor (figura 22, tabla 7).

Respecto al grupo II, del control tratado con vincristina solo sobrevivieron el 40% de la población, sin ser significativo el valor.

La viabilidad de los grupos III tratados con la partición acuoso-metanol, se incrementó significativamente ($p < 0.05$) ya que se observó que en estos grupos sobrevivieron 9 ratones lo que equivale al 60% de viabilidad.

Tabla 7. Efecto de la fracción acuoso-metanol del extracto metanolico de la sobre la supervivencia de ratones con linfoma L5178Y-R

| Grupo | Número de ratones que sobrevivieron después de los 60 días de la inoculación del linfoma | | | | | | |
|---|--|-------------------|-------|-------|-------|-----------------|------------------|
| | RI ^a | %PSI ^b | Exp 1 | Exp 2 | Exp 3 | RF ^c | %PS ^d |
| I. Control | 15 | 100 | 5 | 5 | 5 | 15 | 100 |
| II. Vincristina (0.05 mg/kg) | 15 | 100 | 2 | 1 | 3 | 6 | 40 |
| III. Partición acuoso-metanol (0.5 mg/kg) | 15 | 100 | 3 | 3 | 3 | 9 | 60 |
| IV. Vehículo | 15 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^a Representa el número de ratones iniciales por experimento (5 ratones por repetición)

^b Representa el porcentaje inicial de supervivencia en los 3 experimentos

^c Representa el número total de ratones de los 3 experimentos independientes, que sobrevivieron los 60 días que duró el experimento

^d Porcentaje de supervivencia de ratones tratados con *P. marginatus* y controles. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo (15 en total)

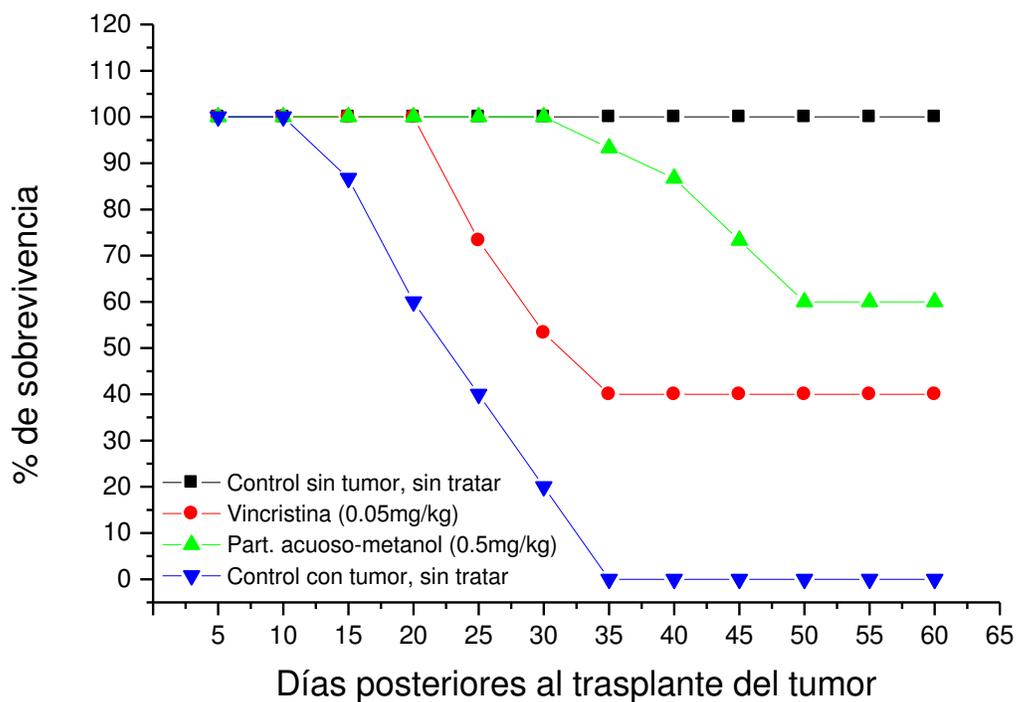


Figura 22. Efecto de la fracción acuoso-matanol del extracto metanolico de la sobre la supervivencia de ratones con linfoma L5178Y-R.. Ratones Balb/c hembras de 2 meses fueron inoculadas en el muslo de la extremidad posterior derecha vía *im*, con la línea celular L5178YR (5×10^6 células/mL). Después de 7 días de la inoculación, se formó un tumor aproximado de 100 cm^3 , los ratones fueron tratados cada 3er día durante 20 días con la partición acuoso-metanol (0.5mg/kg *c/u*) *via oral e iv* vena caudal con vincristina o con el vehículo. La supervivencia se evaluó diariamente durante 60 días.

Análisis de la actividad antioxidante de los extractos crudos *P. marginatus* mediante la prueba con DPPH.

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó la técnica de neutralización del radical DPPH, la cual se realizó en dos fases: la primera consistió en determinar cualitativamente que extractos eran activos, y la segunda fase en determinar qué tan activos eran los extractos positivos.

Análisis cualitativo de la actividad antioxidante de los extractos crudos *P. marginatus* mediante la prueba con DPPH.

Al realizar la prueba cualitativa de los extractos se observó que los extractos crudos de hexano, cloroformo y metanol presentaron actividad antioxidante, así mismo extracto de partición acuosa-metanol se observó mismo resultado (Figura 23). Los resultados positivos son aquellos que presentan manchas claras sobre un fondo morado.

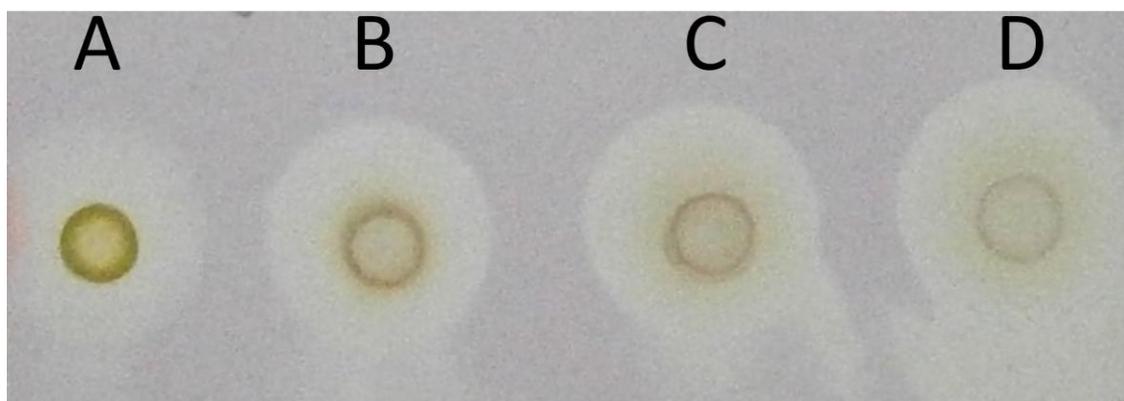


Figura 23. Efecto antioxidante de los extractos crudos de hexano (A), cloroformo (B), metano (C) y la partición acuosa-metanol (D) de *P. marginatus* mediante la técnica de neutralización del radical de DPPH

Análisis cuantitativo de la actividad antioxidante de los extractos crudos *P. marginatus* mediante la prueba con DPPH.

Al realizar la prueba cuantitativa de los extractos se observó que los extractos crudos de hexano, cloroformo, metanol y partición acuosa presentaron actividad antioxidante por encima del 65% de actividad (Figura 24). El extracto crudo de hexano presentó actividad antioxidante del 11.6, 25.2, 44.5, 60.6, 58.9 y 37.2% a las concentraciones de 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mientras que el extracto de cloroformo presentó actividad antioxidante del 33.1, 51.4, 67.7, 72.8, 69.5 y 62.3% a las mismas concentraciones. El extracto metanólico mostró actividad antioxidante de 15.0, 34.9, 63.0, 73.5, 70.9 y 66 %, mientras que la partición acuosa-metanol mostró actividad de 43.1, 68.9, 69.6, 68.3 y 67.3% a las concentraciones de 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, siendo este extracto el que mejor actividad mostró a más baja concentración (Figura 24).

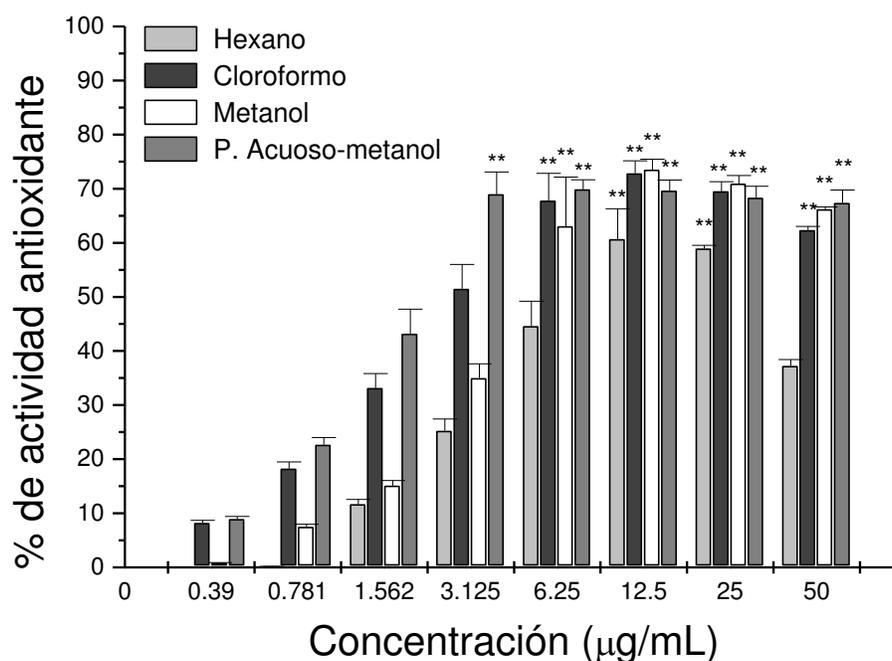


Figura 24. Efecto antioxidante de los extractos crudo de hexano, cloroformo, metanol y la partición acuosa-metanol de *P. marginatus* utilizando placa de 96 pozos para cuantificar la actividad antioxidante mediante la neutralización del radical DPPH.

Análisis de la evaluación hepatotóxica de los extractos crudos *P. marginatus*.

Para la determinación de la hepatotoxicidad se determinaron las actividades en plasma de las enzimas hepáticas además realizó el análisis histopatológico de los órganos de hígado para evaluar el daño tisular.

Mediante la determinación de los pesos corporales se evalúa la calidad de los animales, viendo que todos comenzaban el experimento con similitud de pesos, así mismo después de los tratamientos ya no se observaron diferencia significativa entre los pesos antes y después de los tratamientos (Tabla 8).

Tabla 8. Peso corporal (g) de los ratones antes y después de inducir el linfoma L5178YR y aplicar los extractos crudos de hexano, cloroformo, metanol y la partición acuoso-metanol.

| Grupo | Peso 1 | Peso 2 | Diferencia P2-P1 |
|-------------------|--------|--------|---------------------|
| Sol. salina | 24.5 | 23.9 | -0.6 |
| Hexano | 22.9 | 23.1 | 0.2 |
| Cloroformo | 23.1 | 23.0 | -0.1 |
| Metanol | 24.6 | 24.8 | 0.2 |
| P. acuoso-metanol | 23.1 | 23.2 | 0.1 |

Evaluación de la función hepática *in vivo*

Los ratones tratados con los extractos crudos se les determinó la concentración de las enzimas hepáticas, las cuales se muestran en la tabla 9, y en la cual observamos que los extractos crudos mantienen los límites de las funciones de las enzimas hepáticas, y analizando los valores, para considerar algún daño hepático tendríamos que ver que los valores estuvieran tres veces el límite superior (Benichou 1990).

Tabla 9. Niveles de las enzimas hepáticas en los diferentes grupos de ratones tratados con los extractos crudos de *P. marginatus*

| Grupo/ Enzima | Sol. salina | Hexano | Cloroformo | Metanol | P. acuoso- metanol | Valor normal |
|-----------------------|----------------|--------|------------|---------|-----------------------|-----------------|
| Bilirrubina | 1.51 | 1.34 | 0.33 | 0.84 | 1.34 | 0.1-0.9 |
| Total | | | | | | mg/100mL |
| Proteínas | 5.6 | 8.4 | 9.8 | 5.6 | 7.0 | 2.5-4.8 |
| Totales | | | | | | g/100ml |
| Albumina | 1.5 | 3.3 | 2.3 | 1.5 | 3.0 | 2.5-5.0 |
| | | | | | | g/100ml |
| Globulinas | 4.1 | 5.1 | 7.5 | 4.1 | 3.9 | 0.6 g/ml |
| TGO | 70 | 140 | 140 | 140 | 140 | 70-190 |
| TGP | 70 | 168 | 210 | 140 | 210 | 26-120 |
| Fosfatasa alcalina | 139.96 | 314.92 | 104.97 | 52.48 | 34.99 | 44-120 |

Análisis histológico del hígado *in vivo* tratado con la partición acuso-metanol de *P. marginatus*.

Para evaluar el grado de citotoxicidad de los extractos crudos, a ratones que solo fueron tratados con los extractos cada 3er día durante 20 días sin la inducción del tumor, se les extrajo el hígado y se procesó por el método clásico de fijación de formalina neutra, deshidratación con alcoholes y transparentados con xilol, se les realizaron cortes histológicos teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina

Se realizaron los cortes histológicos a los tejidos de control sano y a los tratados con los extractos. En los tejidos se observaron los hepatocitos con forma poligonal y con membrana celular clara. Los núcleos eran esféricos con superficie regular y con variación ligera de tamaño de una célula a otra. Dentro de los núcleos se observaron gránulos de cromatina con uno o dos nucléolos. En el citoplasma de los hepatocitos se encontró almacenamiento de glucógeno (Figura 25). No se observó ningún indicio de reparación celular, acúmulo de grasa o necrosis celular en los hepatocitos (Figuras 26, 27, 28 y 29). Dentro del tejido se puede ver la triada portal, la cual la constituye la vena, la arteria y el conducto biliar en tejido sano (Figura 30 y 31).

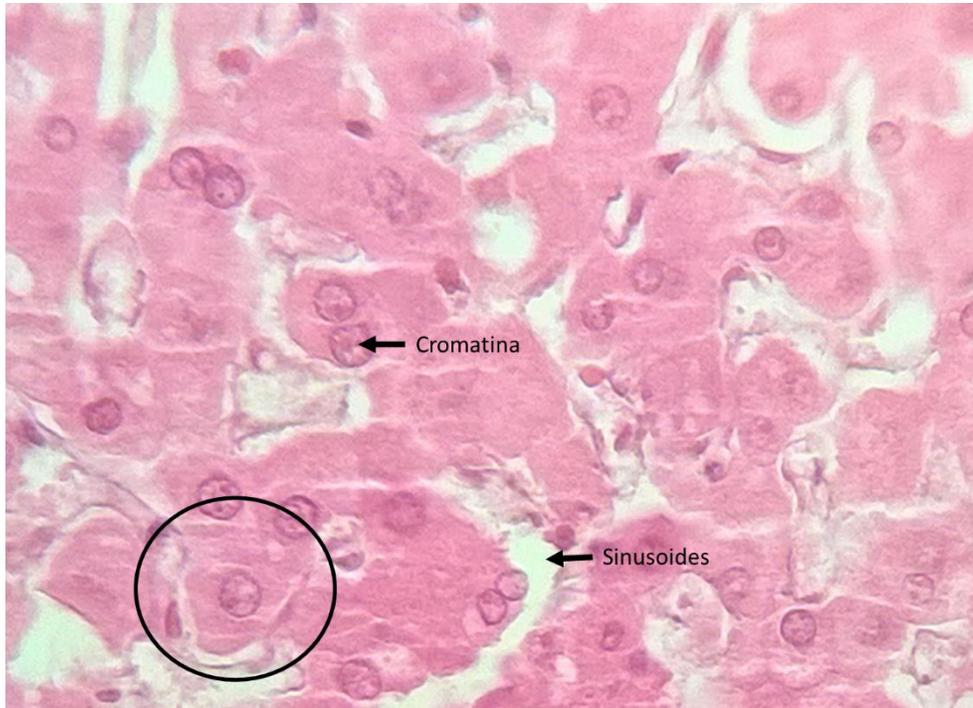


Figura 25. Corte histológico de hígado (100x), mostrando a detalle las características de los hepatocitos (círculo). Tinción con hematoxilina y eosina.



Figura 26. Citotoxicidad en ratones tratados con el extracto crudo de hexano de *P. marfinatus*. Corte histológico de hígado (40x), mostrando a detalle las características del lóbulo hepático, teñido con hematoxilina y eosina. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.



Figura 27. Citotoxicidad en ratones tratados con el extracto crudo de cloroformo de *P. marginatus*. Corte histológico de hígado (40x), mostrando a detalle las características del lóbulo hepático, teñido con hematoxilina y eosina. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

..



Figura 28. Citotoxicidad en ratones tratados con el extracto crudo de metanol de *P. marginatus*. Corte histológico de hígado (40x), mostrando a detalle las características del lóbulo hepático, teñido con hematoxilina y eosina. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

.



Figura 29. Citotoxicidad en ratones tratados con el extracto crudo de la partición acuosa-metanol de *P. marginatus*. Corte histológico de hígado (40x), mostrando a detalle las características del lóbulo hepático, teñido con hematoxilina y eosina. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

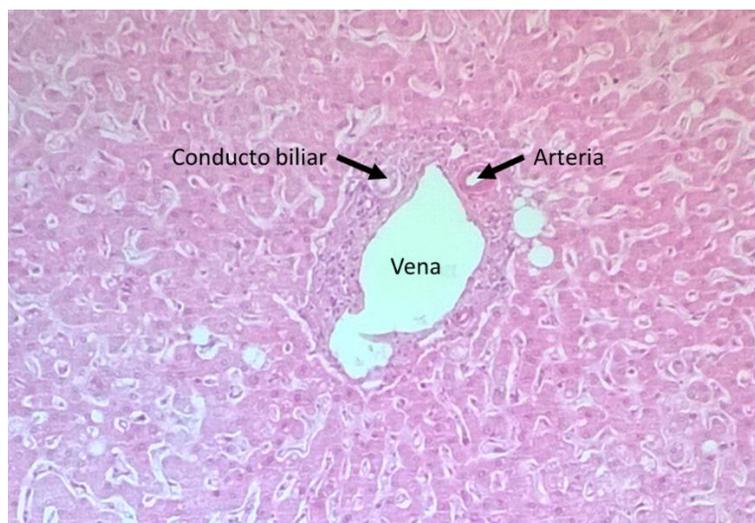


Figura 30. Triada portal hepática, corte teñido con hematoxilina y eosina (10x).

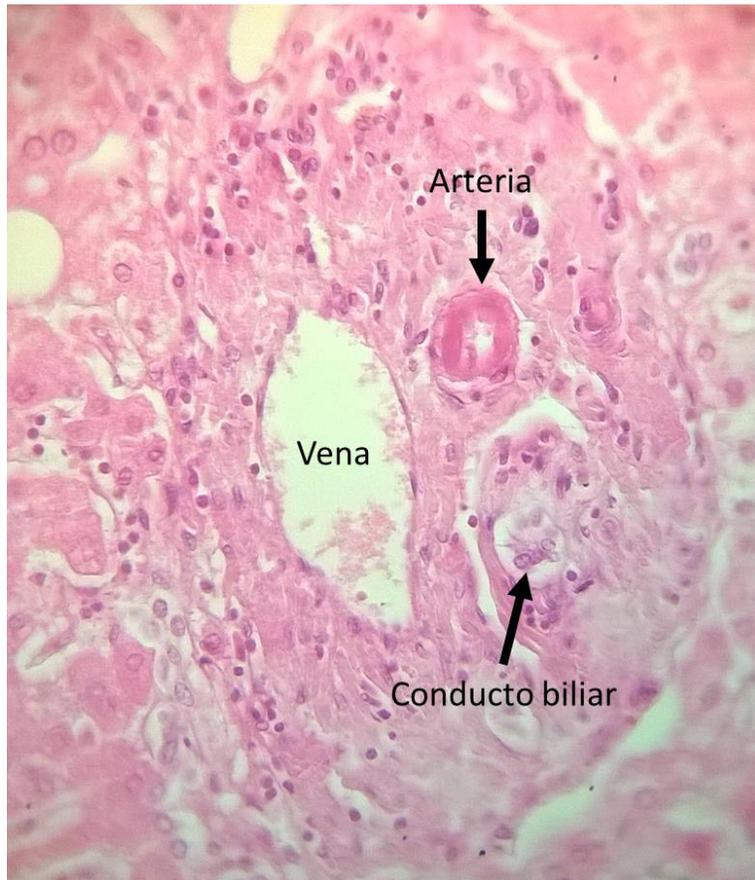


Figura 31. Triada portal hepática, corte teñido con hematoxilina y eosina (40x).

8. DISCUSIÓN

El estudio farmacológico y el uso de compuestos provenientes de plantas con propiedades medicinales resulta ser prometedor, particularmente como una alternativa a la terapia convencional contra cáncer (Tsuda *et al.* 2004).

Los productos naturales representan una rica fuente de compuestos biológicamente activos y que son un ejemplo de la diversidad molecular con un alto potencial en el desarrollo de drogas (Newman *et al.* 2000, 2003; Harlev 2013). De los compuestos anticancerígenos encontrados entre 1940 y 2002, el 40% provienen de productos *per se* o son derivados de productos naturales (Newman *et al.* 2003). Compuestos como el taxol, vincristina, vinblastina, irinotecan, entre otros son compuestos de origen natural usados en la terapia anticancerígena (Lu *et al.* 2003; Plaeger 2003; Rates 2001).

En la familia de las cactáceas se reporta que contiene cerca de 1,500 especies (Harlev *et al.* 2013), de entre las cuales se les han reportado que presentan propiedades para su uso medicinal como antitumoral (Loro *et al.* 1999; Sreekanth *et al.* 2007; Franco-Molina *et al.* 2003; Harlev *et al.* 2013), antiinflamatorio (Park *et al.* 1998; Loro *et al.* 1999; Kim *et al.* 2013), protector neuronal (Kim *et al.* 2013; Shetty *et al.* 2012), protector hepático (Ncibi *et al.* 2008) y contra diabetes (Hassan *et al.* 2011).

El principal objetivo en investigaciones con plantas medicinales es validar científicamente las plantas que se consideran medicinales dentro del folklor regional, ya que principalmente este conocimiento se va pasando de generación en generación mediante pláticas entre los miembros y poca o nula información se documenta por escrito.

De ahí la importancia de validar científicamente, mediante técnicas de laboratorio confiables y repetibles, las propiedades de las plantas que son consideradas medicinales, y de esta manera ampliar las alternativas de tratamientos contra enfermedades como el cáncer.

P. marginatus es un cactus nativo de México y está ligado filogenéticamente con *Lophocereus schottii*, del cual se le ha reportado que presenta citotoxicidad contra células HeLa (Morales-Rubio *et al.* 2006) y linfoma L5178Y-R (Orozco-Barocio *et al.* 2013). El uso medicinal de *P. marginatus* se centra en el tratamiento contra diabetes y enfermedades gastro-intestinales. Debido a su limitado uso medicinal y su relación filogenética con miembros de la familia cactácea que presentan efectos antitumorales, se propuso como objetivo determinar la actividad antitumoral de los extractos crudos de *P. marginatus*.

Los extractos crudos de *P. marginatus* presentan actividad citotóxica en contra de células de linfoma L5178Y-R *in vitro* de la misma manera que *L. schottii*, sin embargo los extractos de *P. marginatus* presentan mayor actividad citotóxica que los extractos de *L. schottii* a la misma concentración (Orozco-Barocio *et al.* 2013).

La apoptosis o muerte celular programada, es un tipo de muerte que ocurre naturalmente en las células o se puede inducir, tal efecto apoptótico activa el sistema inmune de una forma limpia para así estimular al sistema inmune sin dañar tejido sano, sin reacciones adversas y se puede incluir en terapias anticancerígenas.

En el estudio de inmunomodulación los extractos crudos no mostraron un efecto adverso en contra de las células de timo y de bazo, deduciendo que los compuestos presentes en los extractos son selectivos para células cancerígenas y no contra para células residentes sanas.

En el estudio *in vivo* se utilizó el extracto de la partición acuosa-metanol por presentar mejor efecto inmunomodulador y por presentar una actividad citotóxica adecuada como para emplearse en terapias contra el cáncer. De hecho, en los ratones tratados con dicha partición no se observó ningún cambio en el sitio de la inoculación, pero se observó una reducción de la masa tumoral y una sobrevida moderada, resultados similares a los observados con los extractos de *L. schottii* (Orozco-Barocio *et al.* 2013).

Dentro de los reportes de *P. marginatus* se tiene la caracterización y el aislamiento de moléculas como la pilocereina (Djerassi 1954), la lofocereina (Lindgren 1971), el ácido

isocítrico y el ácido quínico (Kringstad y Nordal 1975), los cuales, al ser algunos compuestos alcaloides, han mostrado tener efectos anticancerígenos y reducir la masa tumoral (Wang *et al* 2009; Pettit *et al.* 2009, Li *et al.* 2009, Stærk *et al.* 2002). Debido a esto, es probablemente que la actividad antitumoral que mostraron los resultados se debe principalmente a estas moléculas.

Los terpenos han demostrado ser prometedores agentes antineoplásicos y muestran actividad antiproliferativa contra varias líneas celulares de cáncer. Estudios *in vivo* e *in vitro* recientes han informado que este tipo de moléculas ejercen su actividad directamente sobre el ciclo celular e inducen apoptosis (Palanimuthu *et al.* 2012; Misawa *et al.* 2012; Siddique *et al.* 2011; He *et al.* 2011; Saleem 2009). Hasta el momento no se han encontrado reportes sobre los compuestos químicos aislados de *P. marginatus* que muestren actividad antitumoral.

Por lo tanto es necesario realizar estudios fitoquímicos para el aislamiento e identificación de compuestos activos producidos por *P. marginatus*, además de realizarles estudios adicionales sobre los mecanismos biológicos por los cuales los extractos poseen efecto antitumoral.

Muchos de los medicamentos que actualmente se utilizan para tratar algún malestar, traen consigo reacciones secundarias adversas para el organismo como dolores de cabeza, hipertensión y hepato-toxicidad, entre otros (Stærk, *et al.* 2002). Desafortunadamente, los efectos secundarios de algunos medicamentos como el paracetamol, que por medio de formación de radicales libres (Yu 1994) puede causar una necrosis severa en el hígado (Troncoso y Guija 2007).

Los extractos crudos de *P. marginatus* no mostraron signos de necrosis en el hígado, ni alguna alteración hepática de algún tipo, como hepatocitos binucleados (como consecuencia de la generación celular a causa de un daño), cicatrización o formación de lípidos en el interior del hepatocito. Estos resultados son un buen indicativo de que la administración de extractos de *P. marginatus* es segura y puede indicarse como tratamiento, aunque se requieren análisis a nivel pre-clínico y clínico para corroborar su eficiencia en pacientes, y

así comprobar que no presentan los efectos secundarios no deseados en los demás órganos y sistemas.

Debido al incremento de la resistencia de células tumorales a terapias químicas y los efectos secundarios que producen, es de crítica importancia para el descubrimiento y desarrollo de alternativas anticancerígenas de origen natural con los mínimos, efectos secundarios adversos posibles. En este sentido, la terapia anticancerígena basada en los productos aislados de *P. marginatus* prometen tener potencial uso medicinal y ser una alternativa viable para el tratamiento de tumores.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres extractos crudos los cuales fueron hexano, cloroformo y metanol, y de este último se obtuvo la partición acuosa-metanol.

- a) Los extractos de *P. marginatus* demostraron poseer actividad citotóxica contra células tumorales *in vitro*, donde la citotoxicidad fue mediada por el mecanismo de apoptosis.
- b) Los extractos de *P. marginatus* no mostraron efecto citotóxico en contra de células de timo y bazo.
- c) Los extractos de *P. marginatus* no presentaron actividad hepatotóxica *in vivo* en un modelo murino, donde no se afectó el metabolismo hepático ni los ratones tratados mostraron evidencia de hepatotoxicidad.
- d) Los extractos de *P. marginatus* presentaron actividad antioxidante *in vitro*.
- e) La partición acuosa-metanol presento actividad antitumoral *in vivo* sin presentar efectos de toxicidad aguda.

10. PERSPECTIVAS

Se requieren realizar estudios de fase clínica para comprobar si con el uso de extractos (acuosos) de *P. marginatus* se reduce el tamaño de los tumores tempranos, además de poder comprobar si presenta efectos antioxidantes en los individuos tratados debido a los alcaloides presentes, sin que se vean afectadas células residentes y/o tejidos del paciente.

Faltaría estudiar más a fondo los mecanismos biológicos por el cual *P. marginatus* presenta tales efectos para consumirlo con responsabilidad sobre las patologías que llegara a tener actividad.

11. BIBLIOGRAFIA

American Cancer Society (ACS). 2012. Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta Georgia. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol> Accesado el 25 de febrero del 2013.

Anderson E, Barthlott W, Brown R. 2001. The cactus family. Editorial Timber Press. Portland Oregon, USA. pp. 55, 70:645-646.

Astolfi E. 1988. Toxicología de Pregrado. Ed. Libreros López. Buenos Aires. Pp. 25-50

Arias S, Gama-Lopez S, Guzman-Cruz U, Vazquez-Benitez B. 2012. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlan. Instituto de Biología, Departamento de Botánica, UNAM, Fascículo 95.

Auyang S. 2010. Cancer causes and cancer research on many levels of complexity Disponible en: <http://www.creatingtechnology.org/biomed/cancer.pdf> Accesado el 15 de enero del 2017.

Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M. 1983. Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during *in vitro* growth of L5178Y murine lymphoma cells. Cancer research, 43(10), 4736-4742.

Benichou C. 1990. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. Journal of hepatology 11(2)- 272.

Boise LH, González-García M, Postema CE. 1993. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell. 74:597-08.

Boik J. 1996. Cancer and Natural Medicine. Oregon Medical Press: Minnesota. pp. 5-14.

Bravo-Hollis H, Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp. 127. 161-162.

Bravo-Hollis H, Sánchez-Mejorada H. 1991. Las cactáceas de México, Vol. III. Primera edición. México, D.F. U.N.A.M. pp 511.

Bravo-Hollis H, Sánchez MH. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. pp. 446-453.

Caballero-Hernandez D, Hernandez-Martinez HC, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, Rodriguez-Padilla C. 2014. Aislamiento y evaluación de compuestos fitoquímicos con potencial antitumoral e inmunomodulador en plantas del noreste de México. Planta. 18 (9) 31-34.

Cañigueral S, Dellacassa E, Bandoni A. 2003. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? Latin American Journal of Pharmacy. 22 (3): 265-78

Djerassi, C, Smith R, Marfey SP, McDonald RN, Lemin AJ, Figdor SK, Estrada H. 1954. Alkaloid studies. III. Isolation of Pilocereine and Anhalonidine from four cactus species. *Journal of the American Chemical Society*, 76 (12): 3215-3217.

Dreisbach RH. 1984. *Manual de Toxicología Clínica. Prevención, diagnóstico y tratamiento. El Manual Moderno SA de CV. México DF. pp. 487-520*

Felger R, Moser MB. 1991. *People of desert and sea: ethnobotany of the seri indians. University of Arizona Press. Pp: 435-445*

Fonnegra R. 2007. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Pp: 368.*

Franco-Molina M, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Castillo-Leon L, Rodríguez-Padilla C. 2003. *In vitro* immunopotentiating properties and tumour cell toxicity induced by *Lophophora williamsii* (peyote) cactus methanolic extract. *Phytotherapy Research*. 17:1076-1081.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119(3):493-501.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2004. *Cancer and the Immune System En : Immunology. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. (eds) W. H. Freeman and company: New York. pp 499-522.*

Gomez-Flores R, Verástegui-Rodríguez L, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2009. Antitumor properties of *Gymnosperma glutinosum* leaf extracts. *Cancer Investigation*. 27 (2): 149-155.

Gomez-Flores R, Gracia-Vásquez Y, Alanís-Guzmán MG, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, García-Díaz C, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2009. *In vitro* antimicrobial activity and polyphenolics content of tender and mature *Ebenopsis ebano* seeds. *Medicinal Plants. International Journal of Phytomedicines and Related Industries* 1: 11-19.

Gomez-Flores R, Hernandez-Martínez HC, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Quintanilla-Licea R, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2010. Antitumor and immunomodulating potential of *Coriandrum sativum*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Indian Journal of Natural Products*. 3:54-63.

Gonzalez Y, Recalde L, 2006. *Plantas toxicas de Asuncion y Gran Asuncion. Rojasiana* 7(2):79-89.

Hardman J, Limbird LE. 1996. *Las Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médica Panamericana. 9ª ed. Madrid. Pp:1-50*

Harlev E, Nevo E, Solowey E, Bishayee A. 2013. Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review. *Planta Medica*, 79:713-722.

Hassan F, El-Razek A, Hassan AA, 2011. Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5:356-377.

He Y, Liu F, Zhang L, Wu Y, Hu B, Zhang Y, Li Y, Liu H. 2011. Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Lupeol, a Dietary Triterpene, in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(4) 517—522.

Hunt DR. 1999. CITES Cactaceae check list 2da Royal botanic gardens, Kew y IOS., Milborne Port.

Kim J, Jho KH, Choi YH, Nam SY. 2013 Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. *Food Function*. 30;4(5):681-8.

Klaasen CD, Amdur MD, Doull J. 1986. Casarett and Dull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Ed. Macmillan. New York. Pp: 20-100

Kringstad R, Nordal A. 1975. Lactone-Forming Acids in Succulent Plants. *Phytochemistry*, 14:1868-1870.

Li Ch, Lee D, Graf TN, Phifer SS, Nakanishi Y, Riswan S, Setyowati FM, Saribi AM, Soejarto DD, Farnsworth NR, Falkinham JO, Kroll DJ, Kinghorn AD, Wani MC, Oberlies NH. 2009. Bioactive Constituents of the Stem Bark of *Mitrephora glabra*. *Journal Natural Products*. 72(11): 1949–1953.

Lindgren JE, Agurell S, Lundström J, Svensson U. 1971. Detection of biochemical intermediates by mass fragmentography: Mescaline and Tetrahydroisoquinoline Precursors. *FEBS Letters*, 13 (1): 21-27.

Larrey D. 2002. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Seminars in Liver Disease*. 22: 145–55.

Lee WW. 2003. Drug-Related Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine*. 349:474-485.

Loro JF, Rio I, Perez-Santana L. 1999. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology*. 67:213-218.

Lu Y, Hou SX, Chen T. 2003. Advances in the study of vincristine: an anticancer ingredient from *Catharanthus roseus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 28:1006-1009.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG. 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences* 19: 26-30.

Misawa E, Tanaka M, Nomaguchi K, Nabeshima K, Yamada M, Toida T, Iwatsuki K. 2012. Oral ingestion of *Aloe vera* phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 6 (11):2799-806.

Morales-Rubio ME, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Rivas-Morales C, Arévalo-Niño K, Treviño-Neáñez JF, Carranza-Rosales P, Cruz-Vega DE. 2006. Actividad biológica de *Lophocereus schottii* (ENGELM) Britton and Rose. 2° Congreso Nacional de Química Médica.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. 65:55–63.

Navarro VJ, Senior JR. 2006. Drug-related hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine* 354:731-739.

Ncibi S, Othman MB, Akacha A, Krifi MN, Zorgui L. 2008. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food and Chemical Toxicology*. 46:797-802.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17 (3), 215 – 234.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022 – 1037.

Ocegueda, S, Moreno E, Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62:12-15

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74:609-619.

Orozco-Barocio A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Arreola Nava HJ. Cytotoxic efecto of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: a Mexican medicinal plant. *African Journal Traditional Complement Alternative Medicine*. 10(3):397-404

Palanimuthu D, Baskaran N, Silvan S, Rajasekaran D, Manoharan S. 2012. Lupeol, a bioactive triterpene, prevents tumor formation during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced oral carcinogenesis. *Pathology and Oncology Research*. 18(4):1029-37.

Park EH, Kahng JH, Paek EA (1998). Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Archives of Pharmacal Research*. 21:30-34.

Pettit GR, Ducki S, Eastham SA, Melody N. 2009. Antineoplastic Agents. 454. Synthesis of the strong cancer cell growth inhibitors trans-dihydronarciclasine and 7-deoxy-trans-dihydronarciclasine. *Journal Natural Products*. 72, 1279–1282.

Plaeger SF. 2003. Clinical immunology and traditional herbal medicines. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:337-338.

Qian F, Hanahan DI, Weissman L. 2001. L-selectin can facilitate metastasis to lymph- nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(7):3976-81

Quintanilla-Licea R, Morado-Castillo R, Gomez-Flores R, Laatsch H, Verde-Star MJ, Hernández-Martínez H, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2012. Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules*. 17(9):11229-11241.

Rath M. 2001. Cellular Health Series - Cancer. Published by MR Publishing, Inc., pp:75-85.

Repetto M. 1997. Toxicología Fundamental. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. Madrid. Pp:52-60.

Repetto M, Sanz P. 1993. Glosario de términos usados en Toxicología. Recomendaciones de la IUPAC. Pp:64-67

Rodríguez-Garza RG. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Tesis doctoral FCB-UANL

Saleem, M. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*. 28; 285(2): 109-115.

Sanchez-Torres LE, Diosdado-Vargas F. 2003 Apoptosis: el fenómeno y su determinación, *Técnica Pecuaria en México* 41(1):49-62.

Shetty AA, Rana MK, Preetham SP. 2012. Cactus: A Medicinal Food. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 530-536.

Siddique HR, Saleem M. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sciences*. 14; 88(7-8):285-93.

Sierra F, Torres P. 2004. Enfermedad hepática tóxica inducida por drogas: Revisión sistemática estructurada. *Annals of Hepatology* 3(1):10-25.

Sgro C, Clinard F, Ouazir K. 2002. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population based stud. *Hepatology* 36:451-455.

Stærk D, Lykkeberg AK, Christensen J, Budnik JB, Abe F, Jaroszewski JW. 2002. *In Vitro* cytotoxic activity of phenanthroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Journal Natural Products*, 65, 1299-1302

Sreerkanth D, Arunasree MK, Roy KR, Reddy TC, Reddy GV, Reddanna P. 2007. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine* 14:739-746.

Tortora GJ, Grabowski SR. 2002. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9na edición Editorial Oxford University Press, pp 850-854.

Troncoso L, Guija E. 2007. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anales de la Facultad de Medicina*. 68(4): 333-343.

Tsuda H, Ohshima Y, Hiroshi N, Fujita K, Matsuda E, Ligo M, Takasuka N, Moore MA. 2004. Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 19:245-263.

Valdés-Gutiérrez J, Flores-Olvera H, Ochoterena-Booth H. 1992. “La botánica en el Códice de la Cruz”, *Estudios actuales sobre el Libellus de medicinalibus indorum herbis*, México, Secretaría de Salud, p. 130.

Valiente-Banuet A, Arizmendi MC, Rojas-Martinez A. 1996. Ecological relationship between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 12:103-119.

Wani-Mansukh C, Thompson JB, Taylor HL, Monroe EW, Miller RW y McPhail AT. 1980. X-Ray crystal and molecular structure of the racemic dimeric tetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artifact from *Lophocereus schottii*. *Journal of Chemical Research*, (1):15.

Wang GY, Lv QH, Dong Q, Xu RZ, Dong QH. 2009. Berbamione induces Fas mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and inhibits its tumor growth in nude mice. *Journal of Asian natural products research*. 11(3): 219 – 228.

Zandman-Goddard G, Blank M. 2002. Apoptosis and autoimmunity, *IMAJ* 4:722-724.

12. RESUMEN BIOGRAFICO

Humberto Carlos Hernández Martínez

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL, INMUNOMODULADORA Y HEPATOTOXICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.) BRITTON & ROSE EN UN MODELO MURINO

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Datos personales: Nacido en la ciudad de Monterrey el 17 de abril de 1985, hijo de Humberto N. Hernandez Martínez y Norma C. Martínez Chávez

Educación: Engresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico, Bacteriólogo Parasitólogo en 2009, Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en 2012

Experiencia Profesional: Químico analista en Laboratorio de Análisis Clínicos Moreno – Arzaga (2006-2008), Químico analista en laboratorio de Análisis Clínicos en Santos Hospital (2008-2010), Profesor de Ciencias en Instituto San Roberto (Febrero 2012-Enero 2013), Profesor de Ciencias en el Liceo de Monterrey (Enero 2016 a la fecha),

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACION

Participación en congresos Páginas 75 y 76

- Foro de Investigación 35 Aniversario de UMAE Hospital de Especialidades N. 25. 12 de junio del 2015, Monterrey Nuevo León México.
- 7mo Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y enfermedades infecciosas, 4 al 5 de noviembre del 2014, Monterrey Nuevo León México.

Premios en congresos de investigación. Página 77

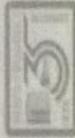
- 2do lugar trabajos de investigación en cartel dentro del Foro de Investigación XXXV Aniversario de UMAE Hospital de Especialidades N. 25. 12 de junio del 2015, Monterrey Nuevo León México.

Artículos Página 78

- Antitumoral activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose extracts against murine lymphoma L5178YR and skin melanoma B16F10 cells. 2016. Humberto Carlos Hernandez-Martinez, Ricardo Gomez-Flores, Patricia Tamez-Guerra, Ramiro Quintanilla-Licea, Mario Angel Samaniego-Escamilla, Enriqueta Monreal-Cuevas, Reyes Tamez-Guerra, Cristina Rodriguez-Padilla. Journal of medicinal plants research. 10(36) 635-639.

Solicitud de patente

- Patente presentada ante el IMPI titulada “Uso del extracto de *Pachycereus marginatus* como agente antitumoral”, con folio Mx/a/2014/011793.



LA UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES No. 25

Otorga el presente

DIPLOMA

A: Humberto Carlos Hernández-Martínez, Ricardo Gómez-Flores,
Patricia Tamez-Guerra, Ramiro Quintanilla-Lica, Mario Ángel
Samaniego Escamilla

Por su participación en el Foro de Investigación XXXV Aniversario
UMAE Hospital de Especialidades No. 25 con el Trabajo de Investigación

*Actividad antioxidante y citotóxica in vitro de extractos de
pachycereus marginatus contra el linfoma murino L5178YR.*

DR. CARLOS ALBERTO PAZQUEZ MARTINEZ
Director de Educación e Investigación en Salud

DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO
Jefe de División de Investigación en Salud

Monterrey, Nuevo León, 12 de Junio de 2015

otorga a:

Humberto Carlos Hernández-Martínez, Ricardo Gomez-Flores, Patricia Tamez-Guerra, Ramiro Quintanilla-Licea, Mario Ángel Samaniego Escamilla.

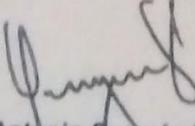
la presente

Constancia

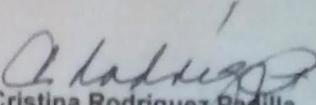
Por la exposición del trabajo titulado: Actividad antioxidante y citotóxica in vitro de extractos de *Pachycereus marginatus* contra el linfoma murino L5178YR, en el 7mo Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas; llevado a cabo en el Centro de Internacionalización, UANL, los días 4 y 5 de Noviembre de 2014.

"Alere Flammam Veritatis"

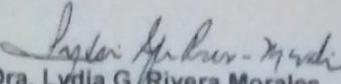
Nuevo León, Noviembre de 2014



Dr. Antonio Guzmán Velasco
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Jefa del Departamento de
Microbiología en Inmunología



Dra. Lydia G. Rivera Morales
Coordinadora del Simposio
Laboratorio de Inmunología y Virología



LA UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES No. 25

Otorga el presente

DIPLOMA

*A: Humberto Carlos Hernández-Martínez, Ricardo
Gómez-Flores, Patricia Tamez-Guerra, Ramiro
Quintanilla-Lica, Mario Ángel Samaniego Escamilla*

Por haber obtenido el 2do. Lugar en área básica de Trabajos de Investigación con el cartel: "Actividad Antioxidante y Citotóxica in vitro de extractos *pachycereus marginatus* contra el linfoma murino L5178YR." dentro del Foro de Investigación XXXV Aniversario

UMAE Hospital de Especialidades No. 25

DR. CARLOS ALBERTO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
Director de Educación e Investigación en Salud

DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO
Jefe de División de Investigación en Salud

Monterrey, Nuevo León, 12 de Junio de 2015

Full Length Research Paper

Antitumor activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells

Humberto Carlos Hernández-Martínez¹, Ricardo Gomez-Flores^{1*}, Patricia Tamez-Guerra¹, Ramiro Quintanilla-Licea², Mario Ángel Samaniego Escamilla², Enriqueta Monreal-Cuevas¹, Reyes Tamez-Guerra¹ and Cristina Rodriguez-Padilla¹

¹Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL. México.

²Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL. México.

Received 25 May, 2016; Accepted 22 July, 2016

Pachycereus marginatus (DC.) Britton & Rose is a species belonging to the family Cactaceae. In traditional medicine, it is recommended to treat diabetes and gastrointestinal infections; however, there are no studies related to its use in cancer treatment. The *in vitro* antitumor effect of *P. marginatus* hexane, chloroform, methanol, and methanol-aqueous partition stem extracts, against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells, was evaluated in liquid medium by the colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. The extracts resulted in up to 84, 85, 84, and 82% cytotoxicity ($p < 0.05$) to L5178Y-R cells, respectively, and up to 39, 51, 48, and 42% cytotoxicity ($p < 0.05$) to B16F10 cells, respectively. Vehicle controls were not cytotoxic for tumor cells, and along with the extracts they did not affect viability of resident murine thymus and spleen lymphocytes. Taken together, the present results showed that *P. marginatus* extracts possess antitumor potential against L5178Y-R lymphoma and B16F10 skin melanoma cells.

Key words: Cancer, cacti, *Pachycereus marginatus*, lymphoma, melanoma, medicinal plants.

INTRODUCTION

In the search for alternatives to treat diseases, researchers worldwide have taken the task of finding

native plants with potential health benefit. Among them, numerous cacti species have been reported to possess

*Corresponding author. E-mail: rgomez60@hotmail.com. Tel: (83) 29-41-10 x 6453. Fax: (83) 52-42-12.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

antitumor properties (Shetty et al., 2012; Harlev et al., 2013; Lema-Rumińska and Kulus, 2014). *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose (Caryophyllales: Cactaceae), also known as *Stenocereus marginatus*, *Cereus marginata*, Central Mexico organ pipe, organo, Jarritos, Chilayo, and Mexican fencepost cactus, belongs to the Pachycereeae tribe. It has columnar trunks that can reach 20 m high and is commonly used as fodder, living fences, fuel wood, and as an alternative medicine. The species is endemic to Mexico, where it grows wild in states that have a dry and hot climate such as Nuevo León, Guanajuato, Aguascalientes, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas, Ciudad de México, Tamaulipas, Guerrero, Michoacán, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Veracruz, Tlaxcala, and Querétaro (Hernández et al., 2004), and in Texas, New Mexico, Arizona, and Southern California (Paredes-Flores et al., 2007; Arias and Terrazas, 2009). *P. marginatus* is traditionally used to treat gastrointestinal infections (Hernández et al., 2003); its antimicrobial potential in plants, animals, and humans has been reported, as well as its activity to improve wound healing, and promote plant growth (Jordan-Hernandez, 2012). However, the antitumor potential of *P. marginatus* has not yet been reported.

Cancer results from the interaction of internal (as genetic predisposition) and external factors that lead to cell degeneration, resulting in precancerous lesions and ultimately malignant tumors. If it is not promptly treated, cancer cells can spread to other organs (metastasis).

Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide, with about 14 million new cases and 8.2 million deaths in 2012 and new cases are expected to increase 22 million in the next 20 years (Stewart and Wild, 2014). In men, most cancers affect prostate, lungs, and gastrointestinal tissues; in women, cancers in the breast, lung, cervix, and stomach are common (Stewart and Wild, 2014). In Mexico, according to the International Union Against Cancer, cancer is the third leading cause of death and estimated that each year 128,000 new cases are reported (Stewart and Wild, 2014).

The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of the hexane, chloroform, methanol, and aqueous methanol partition extracts of *P. marginatus* against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and culture media

Penicillin-streptomycin solution, L-glutamine, and RPMI 1640 and AIM-V media were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY). Fetal bovine serum (FBS), concanavalin A (Con A), sodium dodecyl sulfate (SDS), N, N-dimethylformamide (DMF), and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Vincristine sulfate

was obtained from Laboratorios PiSA (Mexico City, Mexico). The tumor cell lines L5178Y-R (mouse DBA/2 lymphoma R, clone CRL-1722) and B16F10 (mouse skin melanoma) were purchased from The American Type Culture Collection (Rockville, MD), and were maintained in culture flasks with RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, and 0.5% penicillin streptomycin solution (referred as complete RPMI 1640 medium) at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air; cellular density was kept between 10⁵ and 10⁶ cells·ml⁻¹. Extraction buffer was prepared by dissolving 20% (w:v) SDS at 37°C in a solution of 50% each DMF and demineralized water, and the pH was adjusted to 4.7.

Preparation of plant extracts

Pachycereus marginatus used in the present study was identified with voucher number 025588. Stems were rinsed with tap water to eliminate dust and other contaminating material, dried at 37°C for 36 h, and pulverized. Sixty grams of the powdered stems were sequentially extracted with 600 ml of hexane, chloroform, and methanol by Soxhlet system during 40 h each. The extracts were concentrated to dryness using a rotary evaporator Büchi (Brinkmann Instruments Inc., Switzerland) and stored at 6°C until use and dissolved in distilled water for biological activity testing. The methanol-aqueous partition of the extract was prepared by using 11 g of methanol extract and dissolving it in methanol, then in hexane, and shaking for 10 min. The resulting solution was separated with a funnel and washed with ethyl acetate. This solution was washed with water and then dried (referred as aqueous partition). Stock solutions were then prepared at 1 mg ml⁻¹ in complete RPMI 1640 (for L5178Y-R cells), AIM-V medium (for lymphocyte cultures) or DMEM medium (for B16F10 cells), and sterilized by filtering through a 0.22-microns membrane (Millipore, Bedford, MA). *P. marginatus* hexane, chloroform, methanol, and methanol-aqueous partition stem extracts were tested at concentrations ranging from 0.03 to 500 µg ml⁻¹.

L5178Y-R and B16F10 cells preparation and culture

In order to determine the direct *in vitro* effect of the extracts on tumor cell growth, L5178Y-R cell and B16F10 cultures were collected and the cellular suspensions obtained were washed three times in RPMI 1640 (for L5178Y-R cells) or DMEM medium (for B16F10 cells), and suspended and adjusted to 5 × 10⁴ cells ml⁻¹ in those culture media. One hundred microliters of the cell suspensions were then added to flat-bottomed 96-well plates (Becton Dickinson, Cockeysville, MD), containing 100 µl triplicate cultures of complete RPMI 1640 or DMEM media (unstimulated controls), the extracts at various concentrations (extracts were dissolved in complete RPMI 1640 (for L5178Y-R cells) or DMEM medium (for B16F10 cells), extract-free vehicles (vehicles were similarly processed as with *P. marginatus* extracts, but without plant material), and vincristine as a positive control. After incubation for 44 h at 37°C with 5% CO₂, MTT (0.5 mg ml⁻¹, final concentration) was added, and cultures were additionally incubated for 4 h. Next, cell cultures were incubated for 16 h with extraction buffer (100 µl well⁻¹) and optical densities, resulting from dissolved formazan crystals, were then read in a microplate reader (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) at 570 nm (Gomez-Flores et al., 2009). The percentage of cytotoxicity was calculated as follows:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = 100 - [(A570 \text{ in extract treated cells} / A570 \text{ in untreated cells}) \times (100)]$$

Table 1. Effect of *P. marginatus* extracts on L5178Y-R cells toxicity [%].

| Concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] | Hexane | Chloroform | Methanol | Methanol-aqueous partition |
|--|------------|------------|------------|----------------------------|
| 0.03 | 1 | 0 | 14.2±1.9 | 0 |
| 0.06 | 0 | 0 | 16.4±1.4 | 0 |
| 0.121 | 0 | 0 | 8.0±0.6 | 0 |
| 0.243 | 0 | 0 | 15.3±2.0 | 0 |
| 0.487 | 0 | 0 | 17.3±2.4 | 3.0±0.3 |
| 0.975 | 7.8±0.6 | 0 | 22.2±4.7 | 18.1±1.7 |
| 1.95 | 20.0±1.8* | 31.7±1.5* | 31.9±6.3* | 22.1±3.4* |
| 3.9 | 19.5±2.9* | 81.3±6.5** | 36.9±6.8* | 65.3±9.4** |
| 7.81 | 21.7±2.0** | 83.8±5.6** | 69.4±19** | 80.2±2.6** |
| 15.62 | 29.8±4.5** | 84.4±4.7** | 83.7±9.9** | 82.1±5.2** |
| 31.25 | 74.5±3.8** | 84.9±4.4** | 83.6±7.8** | 82.0±4.9** |
| 62.5 | 84.2±6.6** | 84.9±4.3** | 82.9±7.5** | 80.0±5.7** |
| 125 | 84.2±8.6** | 84.4±3.3** | 82.1±9.6** | 77.7±6.3** |
| 250 | 84.8±9.9** | 84.6±2.9** | 79.0±11** | 71.5±4.8** |
| 500 | 84.5±9.9** | 84.1±4.3** | 72.4±11** | 59.4±4.4** |

¹% Cytotoxicity, as compared with untreated control (culture medium). Optical density for untreated control was 0.83 ± 0.006 . Data represent mean \pm SE of three replicate determinations from three independent experiments. Vehicle controls for hexane, methanol, chloroform, and methanol-aqueous partition were not cytotoxic for L5178Y-R cells; vincristine caused about 75% cytotoxicity to L5178Y-R cells at concentrations ranging from 0.24 to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with untreated control.

Animals

Six-week-old female BALB/c mice (22 to 28 g) were purchased from Harlan Sprague-Dawley Inc. (Indianapolis, IN, USA). They were kept in a pathogen- and stress-free environment at 24°C, under a light-dark cycle (light phase, 06:00 to 18:00 h), and given water and food ad libitum.

Cell preparation and culture

Thymus and spleen were removed immediately after mouse death, and a single cell-suspension was prepared by disrupting the organs in RPMI 1640 medium as previously reported (Gomez-Flores et al., 2009). The cell suspensions were washed three times in this medium, suspended, and adjusted to 1×10^7 cells ml^{-1} in complete RPMI 1640 medium.

T cell proliferation assay

T cell proliferation was determined by a colorimetric technique using MTT (Gomez-Flores et al., 2009). Thymus and spleen cell suspensions ($100 \mu\text{l}$ of 1×10^7 cells ml^{-1}) were added to flat-bottomed 96-well plates (Becton Dickinson) containing triplicate cultures ($100 \mu\text{l}$) of RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (unstimulated control), Con A ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and plant extracts at various concentrations for 48 h at 37°C in 95% air-5% CO_2 atmosphere. After incubation for 44 h, MTT (0.5 mg/ml, final concentration) was added, and cultures were additionally incubated for 4 h. Cell cultures were then incubated for 16 h with extraction buffer ($100 \mu\text{l}$), and optical densities, resulting from dissolved formazan crystals, were then read in a microplate reader (Becton

Dickinson) at 570 nm. The lymphocyte proliferation index (LPI) was calculated as follows:

$$\text{LPI} = A_{570} \text{ in extract-treated cells} / A_{570} \text{ in untreated cells}$$

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SE of three replicate determinations from three independent experiments. Statistical significance was assessed by the analysis of variance (ANOVA), $p < 0.05$, and pos-hoc Tukey, using statistical package for social sciences (SPSS) 21.

RESULTS

In vitro cytotoxic activity of *P. marginatus* extracts

The hexane, chloroform, and methanol extracts, respectively caused significant ($p < 0.05$) 20 to 85%, 32 to 84%, and 32 to 72% cytotoxicity to L5178Y-R cells at concentrations ranging from 1.9 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively, and the methanol-aqueous partition caused significant ($p < 0.01$) 65 to 78% cytotoxicity at concentrations ranging from 3.9 to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively, and 72 and 59% cytotoxicity at 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively, as compared with untreated control (Table 1). There was no statistical significance between extract treatment groups, as determined by ANOVA, $p <$

Table 2. Effect of *P. marginatus* extracts on B16F10 cells toxicity [%].

| Concentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$] | Hexane/vehicle | Chloroform/vehicle | Methanol/vehicle | Methanol-aqueous partition/vehicle |
|---|----------------|--------------------|------------------|------------------------------------|
| 1.5 | 1 | 11.3 \pm 0.8 | 8.5 \pm 0.6 | 0 |
| 3.1 | 0 | 7.3 \pm 0.7 | 12.0 \pm 0.7 | 0 |
| 6.2 | 0 | 3.9 \pm 0.4 | 7.0 \pm 0.5 | 0 |
| 12.5 | 0 | 1.3 \pm 0.1 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 42.7 \pm 3.1** | 0 | 39.6 \pm 3.9** |
| 50 | 0 | 51.7 \pm 5.7** | 44.4 \pm 5.2** | 44.1 \pm 5.6** |
| 100 | 39 \pm 1.5** | 50.7 \pm 4.9** | 48.0 \pm 5.8** | 41.9 \pm 5.9** |

¹% Cytotoxicity, as compared with untreated control (culture medium). Optical density for untreated control was 0.29 \pm 0.01. Data represent mean \pm SE of three replicate determinations from three independent experiments. Vehicle controls for hexane, methanol, chloroform, and methanol-aqueous partition were not cytotoxic for B16F10 cells; vincristine caused about 75% cytotoxicity to B16F10 cells at concentrations ranging from 0.24 to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with untreated control.

Table 3. Effect of *P. marginatus* extracts on resident thymus/spleen cells proliferation [LPI].

| Concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] | Hexane | Chloroform | Methanol | Methanol-aqueous partition |
|--|-------------------------|------------|-----------|----------------------------|
| 3.9 | 0.93/ND | 0.85/ND | 0.97/ND | 0.9/ND |
| 7.81 | 0.92 ¹ /1.08 | 0.8/1 | 0.94/0.95 | 0.8/0.98 |
| 15.62 | 0.90/1.07 | 0.8/1 | 0.91/0.96 | 0.7/1 |
| 31.25 | 0.96/1 | 0.8/1 | 0.9/0.96 | 0.9/1 |
| 62.5 | 0.94/1 | 0.81/0.95 | 0.9/0.95 | 0.7/1 |
| 125 | 0.89/0.5 | 0.81/0.84 | 0.92/0.98 | 0.6*/0.82 |

¹LPI, as compared with untreated control (culture medium). Optical density for untreated control was 0.34 \pm 0.002. Data represent mean \pm SE of three replicate determinations from three independent experiments. Vehicle controls for hexane, methanol, chloroform, and methanol-aqueous partition were not cytotoxic for thymus and spleen cells (data not shown). * $p < 0.05$, compared with untreated control. ND, Not done.

0.05, and pos-hoc Tukey. With regards to B16F10 cells, the hexane, chloroform, methanol, and methanol-aqueous partition extracts, respectively caused significant ($p < 0.01$) 39% cytotoxicity at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 43 to 51% cytotoxicity at concentrations of 25 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, 44 to 48% cytotoxicity at concentrations of 25 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively, and 40 to 42% cytotoxicity at concentrations of 25 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively (Table 2), as compared with untreated control. The hexane extract treatment caused the lowest cytotoxicity, whereas the other extract treatments were not significantly different from each other (ANOVA, $p < 0.05$, and pos-hoc Tukey). Vehicle controls for the extracts were not cytotoxic for L5178Y-R or B16F10 cells (data not shown). In addition, extracts were not cytotoxic for murine resident thymus and spleen cells (Table 3), except for the methanol-aqueous partition that caused significant ($p < 0.05$) 40% cytotoxicity to thymic cells at the concentration of 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Table 3).

DISCUSSION

The pharmaceutical study and application of useful compounds from medicinal plants is very promising, particularly as an alternative to conventional cancer therapy (Tsuda et al., 2004). There are many reports on compounds with anticancer properties (Plaeger, 2003), including taxol, vincristine, vinblastine, tepocan, irinotecan, and etoposide-teniposide, which are commonly used in cancer therapy (Lu et al., 2003). The Cactaceae family is reported to contain about 1,500 species, which are distributed worldwide (Harlev et al., 2013). Medicinal uses of cacti include antitumor (Loro et al., 1999; Sreekanth et al., 2007; Franco-Molina et al., 2003; Harlev et al., 2013;), anti-inflammatory (Park et al., 1998; Loro et al., 1999), neuroprotective (Kim et al., 2006; Shetty et al., 2012), hepatoprotective (Ncibi et al., 2008), and anti-diabetes (Hassan et al., 2011) activities.

An important goal in medicinal plant research is to

avoid extensive and repetitive studies on known plants with limited anticancer potential, and focus on promising plants that have not been investigated; the present study was performed following these basic principles. We evaluated antitumor activity of *P. marginatus* crude extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells, and demonstrated cytotoxicity with hexane, chloroform, methanol, and methanol-aqueous partition extracts. Cacti with antitumor potential include *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) Coult., also known as peyote, which was found to be cytotoxic to murine L5178Y-R and fibroblastoma L929, and human myeloid U937 and mammary gland MCF7 tumor cells (Franco-Molina et al., 2003); *Lophocereus schottii* (Engelm.) Britton & Rose has antitumor activity against murine lymphoma (Orozco-Barocio et al., 2013), and *Opuntia* spp. has been reported to have anti-tumor activity (Supino et al., 1996; Veronesi et al., 1999; De Palo et al., 2002; Zou et al., 2005).

The increasing resistance of mammalian tumor cells to chemotherapy, which causes adverse side effects, reduces its clinical efficacy. Thus, it is critical to discover and to develop novel anticancer agents from natural sources, such as plants, to overcome such resistance and side-effects. Cacti-based chemotherapy is a potential alternative to current cancer treatment. After applying *in vitro* bioreactor systems, valuable cacti metabolites could be produced for a large scale at limited costs and time (Lema-Rumińska and Kulus, 2014).

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Programa de Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) of the Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México to RGF. We like to thank Laboratorio de Inmunología y Virología from Facultad de Ciencias Biológicas at UANL for supporting the developing of this study.

REFERENCES

- Arias S, Terrazas T (2009). Taxonomic revision of *Pachycereus* (Cactaceae). *Syst. Bot.* 1:68-83.
- De Palo G, Mariani L, Camerini T, Marubini E, Formelli F, Pasini B, Decensi A, Veronesi U (2002). Effect of fenretinide on ovarian carcinoma occurrence. *Gynecol. Oncol.* 86:24-27.
- Franco-Molina M, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Castillo-Leon L, Rodríguez-Padilla C (2003). *In vitro* immunopotentiating properties and tumour cell toxicity induced by *Lophophora williamsii* (peyote) cactus methanolic extract. *Phytother. Res.* 17:1076-1081.
- Gomez-Flores R, Verastegui-Rodríguez L, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C (2009). Antitumor properties of *Gymnosperma glutinosum* leaf extracts. *Cancer Invest.* 27:149-155.
- Harlev E, Nevo E, Solowey E, Bishayee A (2013). Cancer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: a review. *Planta Med.* 79:713-722.
- Hassan F, El-Razek A, Hassan AA (2011). Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats. *Austr. J. Basic Appl. Sci.* 5:356-377.
- Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C, Goettsch B (2004). Checklist of Chihuahuan Desert Cactaceae. *Harv. Pap. Bot.* 9:51-68.
- Hernández T, Canales M, Ávila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol.* 88:181-188.
- Jordan-Hernandez JL (2012). *Pachycereus* plant extract and methods of use thereof. Patent WO 2012162471 A2. Available at: <http://www.freepatentsonline.com/WO2012162471.html>
- Lema-Rumińska J, Kulus D (2014). Micropropagation of cacti – a review. *Haseltonia* 19:46-63.
- Loro JF, Rio I, Perez-Santana L (1999). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 67:213-218.
- Lu Y, Hou SX, Chen T (2003). Advances in the study of vincristine: an anticancer ingredient from *Catharanthus roseus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 28:1006-1009.
- Ncibi S, Othman MB, Akacha A, Krifi MN, Zorgui L (2008). *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food Chem. Toxicol.* 46:797-802.
- Orozco-Barocio A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Arreola-Nava HJ (2013). Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: a Mexican medicinal plant. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 10:397-404.
- Paredes-Flores M, Lira-Saade R, Dávila-Arana P (2007). Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta Bot. Mex.* 79:13-61.
- Park EH, Kahng JH, Paek EA (1998). Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* 21:30-34.
- Plaeger SF (2003). Clinical immunology and traditional herbal medicines. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:337-338.
- Shetty AA, Rana MK, Preetham SP (2012). Cactus: a medicinal food. *J. Food Sci. Technol.* 49(5):530-536.
- Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, Reddy TC, Reddy GV, Reddanna P (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine* 14:739-746.
- Stewart BW, Wild CP (2014). World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 505.
- Supino R, Crosti M, Clerici M, Warlters A, Clerici L, Zunino E, Formelli F (1996). Induction of apoptosis by fenretinide (4-HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression. *Int. J. Cancer* 65:491-497.
- Tsuda H, Ohshima Y, Hiroshi N, Fujita K, Matsuda E, Ligo M, Takasuka N, Moore MA (2004). Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19:245-263.
- Veronesi U, De Palo G, Marubini E, Costa A, Formelli F, Mariani L, Decensi A, Camerini T, Del Turco MR, Di Mauro MG, Muraca MG, Del Vecchio M, Pinto C, D'Aiuto G, Boni C, Campa T, Magni A, Miceli R, Perloff M, Malone WF, Sporn MB (1999). Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1847-1856.
- Zou DM, Brewer M, Garcia F, Feugang JM, Wang J, Zang R, Liu H, Zou CP (2005). Cactus pear: A natural product in cancer chemoprevention. *Nutr. J.* 4:25.



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisional de Patentes

OFICINA REGIONAL DEL NORTE

Solicitud Expediente: **MX/a/2014/011793**
Fecha: **30/SEP/2014** Hora: **13:52:41**
Folio: **MX/E/2014/069760** 971252



MX/E/2014/069760

- Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
- Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo del IMPI

No. de expediente

No. de folio de entrada

Fecha y hora de presentación

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

- El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente
- 1) Nombre (s): **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.**
- 2) Nacionalidad (es): **MEXICANA.**
- 3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66451.**
Población, Estado y País: **SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**
- 4) Teléfono (clave): 5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

- 6) Nombre (s): **A) DR. RICARDO ALBERTO GÓMEZ FLORES. B) DR. RAMIRO QUINTANILLA LICEA. C) DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA. D) QBP. MARIO ÁNGEL SAMANIEGO ESCAMILLA. E) M.C. HUMBERTO CARLOS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ.**
- 7) Nacionalidad (es): **A) MEXICANA. B) MEXICANA. C) MEXICANA. D) MEXICANA. E) MEXICANA.**
- 8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **A) RÍO GUADALQUIVIR NO. 401-B ORIENTE, COL. DEL VALLE, C.P. 66220. B) SENDA PERPETUA NO. 5935, COL. VILLA LAS FUENTES, C.P. 64890. C) RÍO GUADALQUIVIR NO. 401-B ORIENTE, COL. DEL VALLE, C.P. 66220. D) GÓMEZ PALACIO NO. 717, COL. MITRAS NORTE, C.P. 64320. E) SAN PEDRO NO. 1210, BALCONES DE SANTO DOMINGO, C.P. 66446.**
Población, Estado y País: **A) SAN PEDRO GARZA GARCÍA, NUEVO LEÓN, MÉXICO. B) MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO. C) SAN PEDRO GARZA GARCÍA, NUEVO LEÓN, MÉXICO. D) MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO. E) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**
- 9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

- 11) Nombre (s): **DR. RICARDO ALBERTO GÓMEZ FLORES.** 12) RGP: **RGPD-DAJ-22354.**
- 13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **AV. LÁZARO CÁRDENAS NO. 4600 OTE. ENTRE PRAGA Y TRIESTE, CENTRO DE INCUBACIÓN DE EMPRESAS Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA (CIETT), UNIDAD MEDEROS, C.P. 64930.**
Población, Estado y País: **MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO.** 14) Teléfono (clave): **(81) 83294282.**
- 15) Fax (clave):
- 16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: **LIC. ANGELA GABRIELA CARRILLO RODRÍGUEZ, ING. ADRIÁN GERARDO MARROQUÍN ORTEGA, LIC. FERNANDO FIGUEROA GARCÍA.**

17) Denominación o Título de la Invención:
USO DEL EXTRACTO DE PACHYCEREUS MARGINATUS (CACTUS ÓRGANO, CHILAYO O MALINCHE) COMO AGENTE ANTITUMORAL.

| | | |
|--|--------------------------------------|--|
| 18) Fecha de divulgación previa Día Mes Año | 19) Clasificación Internacional | uso exclusivo del IMPI |
| 20) Divisional de la solicitud Número | Figura jurídica | 21) Fecha de presentación Día Mes Año |
| 22) Prioridad Reclamada: País | Fecha de presentación Día Mes Año | No. de serie |

Lista de verificación (uso interno)

| No. Hojas | | No. Hojas | |
|-----------|--|-----------|--|
| | Comprobante de pago de la tarifa | | Documento de cesión de derechos |
| | Descripción y reivindicación (es) de la invención | | Constancia de depósito de material biológico |
| | Dibujo (s) en su caso | | Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa |
| | Resumen de la descripción de la invención | | Documento (s) de prioridad |
| | Documento que acredita la personalidad del apoderado | | Traducción |
| | | | TOTAL DE HOJAS |

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

DR. RICARDO ALBERTO GÓMEZ FLORES
Nombre y firma del solicitante o su apoderado

MONTERREY, N. L.
A 17 DE SEPTIEMBRE DE 2014
Lugar y fecha

Consideraciones generales para su llenado:

- Este formato es de distribución gratuita. Se autoriza su libre reproducción, siempre y cuando éste no sea alterado y sea presentado impreso su anverso (Página 1) y reverso (Página 2) en una sola hoja de papel blanco y en tamaño oficio.
- Debe llenarse en idioma español, preferentemente a máquina. No obstante, podrá presentarse con letra de molde, siempre que la solicitud sea legible. La información de la solicitud debe ser requisitada toda por el mismo medio, sin tachaduras ni enmendaduras.
- El formato de solicitud por duplicado, debidamente requisitado y firmado en todos sus ejemplares, así como sus documentos anexos, deben presentarse en la Coordinación Departamental de Recepción y Control de Documentos de la Dirección Divisional de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, con domicilio en Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Delegación Xochimilco, C.P. 16020, México, D.F., con horario de atención de 8:45 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Oficinas Regionales del IMPI o las Delegaciones o Subdelegaciones Federales de la Secretaría de Economía.
- También podrá remitirse la solicitud por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes o, en su caso, presentarse por transmisión telefónica facsimilar, en los términos previstos en el artículo 5o. del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Los documentos anexos redactados en idioma distinto al español deberán acompañarse de la traducción correspondiente.
- Los documentos anexos provenientes del extranjero, cuando proceda, deberán acompañarse de la legalización o, en su caso, apostilla correspondiente.

- En el formato de solicitud marque con una X en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
 - País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
- En el listado de documentos que se anexan mencione el total de hojas que comprende cada documento y al final el total de hojas

Trámite al que corresponde la forma: Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad.

Número de Registro Federal de Trámites y Servicios: IMPI-03-001, IMPI-03-002, IMPI-03-003.

Fecha de autorización de la forma por parte de la Dirección General Adjunta de Propiedad Industrial del IMPI: 2-XII-2011.

Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria: 8-XII-2011.

Fundamento jurídico-administrativo:

Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 38-47, 50, 52, 53 54, 55,-61 (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 2-VIII-94, 25-X-96, 26-XII-97,17-V-99, 26-I-04, 16-VI-05, 25-I-06, 06-V-09, 06-I-10, 18-VI-10 y 28-VI-10).

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 5-8, 16, 24-39, 43, 45 y 46 (D.O.F. 23-XI-94, reformas D.O.F. 10-IX-02, 19-IX-03 y 10-VI-11).

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 3-10 y 34 (D.O.F. 14-XII-94, reformas D.O.F. 22-III-99, 14-XII-00, 20-VI-03, 11-VII-03, 18-III-10 y 2-IV-10).

Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 1 inciso a); 9, inciso a) y demás aplicables ((D.O.F. 23-VIII-95, reformas D.O.F. 28-XII-95, 10-XII-96, 2-V-97, 4-V-98, 23-II-99, 11-X-00, 17-X-01, 13-XI-01, 24-XII-01, 27-II-02, 14-III-02, 14-XI-02, 04-II-03, 8-X-03, 27-X-04, 23-III-05, 13-IX-07, 1-VI-09, 10-VIII-09, 24-VIII-09, 1-X-10 y 10-V-11).

Acuerdo por el que se da a conocer la lista de instituciones reconocidas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para el depósito de material genético (D.O.F. 30-V-97).

Acuerdo por el que se establecen reglas y criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art. 4-18 (D.O.F. 9-VIII-04).

Acuerdo por el que se dan a conocer los horarios de trabajo del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art.1. (D.O.F. 31-III-99, reforma D.O.F. 20-I-11).

Documentos anexos:

Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (duplicado)

Solicitud de Registro de Diseño Industrial

- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (duplicado)
- **Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:**
 - Constancia de depósito de material biológico
 - Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
 - Acreditación del poderdante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
 - Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
 - Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia)
 - Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
 - Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

Criterios de resolución del trámite

- Presentar toda la documentación requerida y pagos de la tarifa conforme a la legislación nacional y convenios internacionales de los que México forma parte.
- Será suficiente el cumplir con los requisitos formales al momento de presentar su solicitud.

Tiempo de respuesta:

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses. No aplica la positiva ni la negativa ficta.

Número telefónico para quejas:

Órgano Interno de Control en el IMPI
5624-04-12 ó 13 (directo)
5624-04-00 (conmutador)
Extensiones: 11028 y 11234.
Fax: 56-24-04-35
Correo electrónico: quejanet@impi.gob.mx

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL a los teléfonos: 20002000 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01-800-11205-84 o desde Estados Unidos y Canadá al 1-800-475-23-93.

Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 53 34 07 00 extensiones 10098 y 10026.