



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE GENOTIPOS DE  
*Sechium edule* (Jacq.) Sw. SOBRE CÁNCER DE MAMA. .**

**BIÓL. MARIA TERESA URIOSTEGUI ARIAS**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2014**

---

La presente tesis titulada: ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE GENOTIPOS DE *Sechium edule* (Jacq.) Sw. SOBRE CÁNCER DE MAMA. Realizada por la alumna: MARIA TERESA URIOSTEGUI ARIAS, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

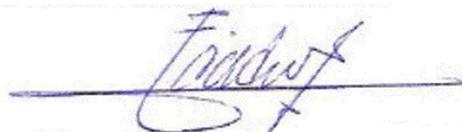
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



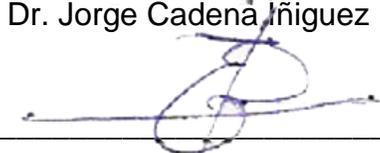
Dr. R Marcos Soto Hernández

ASESOR



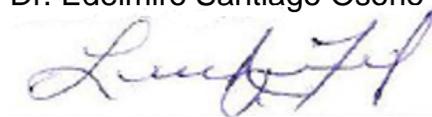
Dr. Jorge Cadena Íñiguez

ASESOR



Dr. Edelmiro Santiago Osorio

ASESOR



Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2014

# **Análisis fitoquímico y efecto antiproliferativo de genotipos de *Sechium edule***

**(Jacq.) Sw. sobre cáncer de mama.**

**Maria Teresa Uriostegui Arias M.C**

**Colegio de Postgraduados, 2014**

## **RESUMEN**

*Sechium edule*, presenta en México una amplia diversidad biológica de la cual se han creado hibridaciones de distintas variedades mismas que presentan frutos de diferente forma, tamaño, color, sabor y textura, los cuales han sido utilizados como fuente de alimento y medicinal. En esta investigación se evaluó la actividad antiproliferativa de los genotipos Madre negra, amargo 290, H387-07 Y H369- 12 pertenecientes a *Sechium edule* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7. Además se identificó los a principales compuestos responsables de dicha actividad a través de un estudio biodirigido. Se observó que los extractos crudos obtenidos en metanol tuvieron el mayor rendimiento donde se evidenció la presencia de terpenos, flavonoides, saponinas y taninos. Al realizar los ensayos biológicos iniciales con los extractos crudos, se observó que la variedad Madre negra tuvo una IC<sub>50</sub> de 6.44 ug/mL, mientras que H387-07-GISem fue de IC<sub>50</sub> 9 ug/mL. Por otra parte en los extractos preparados con hexano, diclorometano y metanol, se observó presencia de terpenos en los dos primeros y flavonoides con el último solvente. En los ensayos farmacológicos el extracto en diclorometano de la variante Madre Negra y el de hexano de H387-07-GISem presentaron las mejores concentraciones inhibitorias promedio. Se hizo fraccionamiento de los dos extractos donde en el caso de H387-07-GISem se obtuvieron seis fracciones

totales, ninguna presento una actividad antiproliferativa significativa con respecto al extracto inicial lo cual indico que el conjunto de su composición podría ser causante de dicha actividad antiproliferativa, mientras en el caso de Madre negra se obtuvo ocho fracciones totales de las cuales dos presentaron actividad antiproliferativa significativa ( $p < 0.05$ ) comparativamente con lo registrado por extracto completo en Diclorometano compuesto por una diversidad de cucurbitacinas.

**Phytochemical analysis and antiproliferative effect of genotypes *S. edule***

**(Jacq.) Sw. On breast cancer.**

**Maria Teresa Arias Uriostegui M.C**

**Colegio de Postgraduados, 2014**

**ABSTRACT**

*Sechium edule*, Mexico presents a wide biodiversity that have created hybrids of different varieties that present themselves differently fruit shape, size, color, flavor and texture, which have been used as a food source and medicinal. In this study the antiproliferative activity was evaluated Black Mother genotypes, bitter 290, H387-07 Y H369- *Sechium edule* 12 belonging to the cell line of MCF7 breast cancer. Besides leading to compounds responsible for this activity through a biodirigido study was identified. It was observed that the crude extracts obtained in methanol had the highest performance in which the presence of terpenes, flavonoids, tannins, saponins and evidenced. When performing the initial bioassay of crude extracts, it was observed that black Mother Variety had an IC50 of 6.44 ug/mL, while H387-07-gisem IC50 was 9 ug/mL. Moreover in extracts prepared with hexane, dichloromethane and methanol, the presence of terpenes was observed in the first and the last two flavonoids solvent. In pharmacological tests the dichloromethane extract of the Black Madonna and hexane variant of H387-07-gisem inhibitory concentrations showed the best average. Fractionation of the two extracts which total six fractions were obtained in the case of H387-07-gisem was made, none present a significant antiproliferative activity relative to the initial sample which indicated that its overall composition could be causing this

antiproliferative activity while in the case of black mother total eight fractions of which two had significant antiproliferative activity ( $p < 0.05$ ) in comparison with the fully registered dichloromethane extract comprises a variety of cucurbitacins was obtained.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados y en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, IUDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, con material biológico del Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISEM) y con el apoyo económico de beca para los estudios de maestría del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Marcos Soto Hernández, por guiarme en este proceso, por brindarme su amistad, dedicación y paciencia.

Al Dr. Jorge Cadena Iñiguez por brindarme la oportunidad de trabajar en este hermoso proyecto, apoyarme y aconsejarme.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, su colaboración y disponibilidad para este trabajo.

A la Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas por brindarme su apoyo y disponibilidad.

A la MC. Itzen por su apoyo técnico y consejos para la finalización de este trabajo.

A la Biól. Aidé el apoyo en la realización de los ensayos biológicos.

Al MC. Rubén por su apoyo brindado para la terminación este trabajo.

Al. Sr. Domingo y todos los integrantes del Laboratorio de Fitoquímica por el apoyo durante mi estadía.

## DEDICATORIAS

A mis padres Norberto y Telma Elisa, gracias por apoyarme en mis decisiones por nunca soltar mi mano, ser mis mejores amigos, consejeros, por llenarme de amor y enseñarme a luchar día con día sin dejarme vencer.

A mi esposo Fernando, Gracias por ser mi compañero es esta aventura que decidimos vivir juntos, por ser mi soporte para seguir adelante, llenar mi vida de ilusión, amor y esperanza. Te amo

A mis hermanos Santiago y Jesús gracias por ser mis cómplices, acompañarme y llenar mis días de alegría.

A mi abuelo Pablo Arias (+) por ser mi fuente de inspiración, mi motivo inicial por el cual nació el interés en este trabajo, siempre en mi mente y corazón....

A mis abuelos por llenarme de sabios consejos.

A mis amiga de toda la vida Daniela por tu amistad a pesar de la distancia.

A amiga Macri gracias por estar ahí cuando lo necesite.

A todos los que confiaron en mí y siempre me dieron palabras de aliento para llegar a la meta de esta etapa.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Metabolismo secundario</b> .....	1
<b>1.2 Familia Cucurbitácea</b> .....	3
<b>1.3.1 <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.</b> .....	5
<b>1.3.2 Diversidad genética de <i>Sechium edule</i></b> .....	7
<b>1.3.3 Importancia alimenticia de <i>Sechium edule</i>.</b> .....	9
<b>1.3.4 Importancia farmacológica</b> .....	10
<b>1.4 Cáncer</b> .....	12
<b>1.5 Cáncer de mama</b> .....	14
<b>1.6 Carcinoma ductal in situ (DCIS)</b> .....	14
<b>1.7 Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante) (IDC)</b> .....	15
<b>1.9 Cáncer inflamatorio del seno (IBC)</b> .....	16
<b>1.10 Estadísticas del cáncer de mama a nivel mundial.</b> .....	16
<b>1.11 Cáncer de mama en México</b> .....	17
<b>1.12 Tratamientos para el cáncer y efectos secundarios</b> .....	18
<b>1.13 Plantas medicinales: alternativa viable para el tratamiento contra el     cáncer.</b> .....	18
<b>2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA</b> .....	20
<b>2.1 Enfoque científico</b> .....	20
<b>2.2 Enfoque social</b> .....	20
<b>2.3 Enfoque económico</b> .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	22

3.2 Objetivos específicos .....	22
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Material vegetal .....	24
4.2 Variables .....	24
4.3 Extracción de metabolitos secundarios .....	25
4.3.1 Preparación de material .....	25
4.3.2 Análisis preliminar de compuestos principales.....	25
4.3.3 Preparación de extractos crudos en metanol y por extracción selectiva en hexano- diclorometano y metanol).....	28
4.4 Identificación de terpenos y Flavonoides .....	29
4.5 Fraccionamiento de extractos e identificación de fracciones activas ..	30
4.5.1 Fraccionamiento por CCF del extracto H387-07 en hexano.....	30
4.5.2 Fraccionamiento por columna (CC) de extracto Madre Negra en diclorometano .....	31
4.5.3 Identificación de compuestos activos del extracto en diclorometano por CCF de la variedad Madre Negra .....	31
4.5.4 Identificación de compuestos activos de Madre negra en diclorometano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ..	32
4.4 Material celular .....	33
4.4.1 Cultivo de línea celular .....	33
4.4.2 Dilución de extractos.....	34
4.4.3 Evaluación de la proliferación celular .....	34
4.4.4 Obtención de IC <sub>50</sub> de extractos .....	35
4.4.5 Análisis estadístico.....	35
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>

<b>5.1 Obtención de extractos crudos e identificación de principales compuestos secundarios</b> .....	36
<b>5.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa e IC<sub>50</sub> de extractos crudos</b>	38
<b>5.3 Identificación de terpenos y flavonoides por cromatografía en capa fina (CCF)</b> .....	41
<b>5.4 Comparación de la actividad antiproliferativa y obtención de IC<sub>50</sub>: extractos-genotipos</b> .....	46
<b>5.5 Fraccionamiento de extractos de genotipos sobresalientes por actividad antiproliferativa- polaridad-solvente</b> .....	50
<b>5.5.1 Identificación de compuestos de las fracciones de H387-07</b> .....	50
<b>5.5.2 Identificación de compuestos de las fracciones de Madre Negra</b> .....	54
<b>5.3 Identificación de principales compuestos activos: fracción-genotipo sobresaliente-actividad biológica</b> .....	57
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	67

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Grupos varietales de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (a1): *nigrum levis* (a2), *albus levis* (a3), *albus dulcis* (a4), *nigrum conus* (a5), *albus minor* (a6), *nigrum minor* (a7), *Sechium edule silvestre* (a8), *nigrum maxima* (a9), *nigrum xalapensis* (a10), *virens levis* (a11), *nigrum spinosum*, (a12), *albus spinosum* (Cadena-Iñiguez, 2008) Además de hibridaciones recientes, el grupo Interdisciplinario de investigación de *Sechium edule* en México (GISEM), detecto el linaje genético del híbrido H387-07- GISEM producto de los cruzamientos entre las variedades *Sechium edule* var. *virens levis* por *Sechium edule* var. *Amarus silvestris* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (GISEM, 2008). ..... 8

**Figura 2.** Efecto antiproliferativo de extractos crudos A) Amargo 290, B) Madre negra, C) HD369-12 y D) H387-0, sobre cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey  $p < 0.05$ ). ..... 39

**Figura 3.** Identificación de terpenos de extractos en hexano, fase móvil Diclorometano-Metanol (19:2), Revelador vainillina/ácido sulfúrico al 50%, revelado a 110 °C. 1: Cucurbitacina B, 2: Cucurbitacina B y D, 3: Amargo 290-GISEM, 4: Madre negra-GISEM, 5: HD369-12-GISEM, 6: H387-07-GISEM, 7: Cucurbitacina I y 8: Cucurbitacina E. .... 41

**Figura 4.** Identificación de terpenos en extractos de diclorometano, fase móvil Diclorometano-Metanol (19:2), Revelador vainillina-ácido sulfúrico al 50% 110 °C. 1: Cucurbitacina B, 2: Cucurbitacina B y D, 3: Amargo 290-GISEM, 4: Madre negra-GISEM, 5: HD369-12-GISEM, 6: H387-07-GISEM, 7: Cucurbitacina I y 8: Cucurbitacina E. .... 43

**Figura 5.** Identificación de Flavonoides de extractos en metanol, fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-H<sub>2</sub>O (12.5:1.3:1.3:3.2), Revelador NP/PEG 1: Amaro 290-GISEM 2: Madre negra-GISEM 3: HD369-12-GISEM 4: H387-07-GISEM. .... 45

**Figura 6.** Efecto antiproliferativo de extractos en hexano de Madre negra y H387-07, sobre cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey p<0.05). .... 46

**Figura 7.** Efecto antiproliferativo de extractos en diclorometano de Madre negra y H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey p<0.05). .... 47

**Figura 8.** Efecto antiproliferativo de extractos en metanol de Madre negra y H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluados con la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey p<0.05) .... 48

**Figura 9.** Cromatoplaqueta de las fracciones obtenidas en cromatografía en capa fina del extracto en hexano de H387-07. Fase móvil de Hexano/Acetato de etilo (16:4) revelándose con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> calentándola a 110 °C. .... 52

**Figura 10.** Efecto antiproliferativo de fracciones de H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo, extracto inicial en hexano de H387-07 y un pool de fracciones. Diferencia significativa respecto al control\*, respecto al extracto inicial † (Tukey  $p < 0.05$ )..... 53

**Figura 11.** Fracciones finales de Madre negra. Fase móvil hexano/acetato de etilo (50:50), revelado con vainillina +  $H_2SO_4$  a 110 °C. 1: Cucurbitacina E, 2: Cucurbitacina I, 3: f1, 4: f2, 5: f3, 6: f4, 7: f5, 8: f6, 9: f7, 10: f8, 11: cucurbitacina B, 12: cucurbitacina B y D. .... 55

**Figura 12.** Efecto antiproliferativo de las fracciones de Madre negra, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo, extracto inicial en diclorometano de madre negra y un pool de fracciones. Calculando su diferencia significativa respecto al control\*- respecto al extracto inicial † (Tukey  $p < 0.05$ ). .... 56

**Figura 13.** Identificación de fracciones de Madre negra-GISEM, fase móvil hexano-acetato de etilo (90:10), revelado con vainillina/ ácido sulfúrico al 50% 110 °C. 1: Cucurbitacinas E, 2: Cucurbitacina I, 3: F3 (1) ,4: F3 (2), 5: F3 (3), 6: F5 (1), 7: F5 (2), 8: F5 (3), 9: F5 (4), 10: Cucurbitacina B, 11: Cucurbitacina D. .... 58

**Figura 14.** Análisis por HPLC de la fracción tres Madre negra polaridad diclorometano..... 61

**Figura 15.** Análisis por HPLC de fracción cinco Madre negra polaridad diclorometano..... 62

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efectos farmacológicos de <i>Sechium edule</i> .....	11
Tabla 2. Genotipos de frutos de <i>Sechium edule</i> .....	24
Tabla 3. Rendimiento de extractos crudos de frutos de los cuatro genotipos de <i>Sechium edule</i> : Madre negra, Amargo 290, HD369-12 y H387-07 .....	37
Tabla 4. Metabolitos secundarios presentes en extractos crudos de frutos de cuatro genotipos de <i>Sechium edule</i> . .....	38
Tabla 5. Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de extractos crudos de los cuatro genotipos de <i>Sechium edule</i> , sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7...	40
Tabla 6. Índice de retención (rf) de extractos en hexano de cuatro genotipos de <i>Sechium edule</i> .....	42
Tabla 7. Índice de retención de extractos en diclorometano de genotipos de <i>Sechium edule</i> .....	44
Tabla 8. Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de extractos en hexano, diclorometano y metanol de los genotipos madre negra y H387-07, sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7. ....	49
Tabla 9. Fracciones y rendimientos obtenidos del fraccionamiento en cromatografía en capa fina CC del extracto en hexano H387-07.....	51
Tabla 10. Fracciones y rendimientos obtenidos del fraccionamiento en cromatografía en capa fina CCF del extracto en diclorometano de Madre negra.	59

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Metabolismo secundario

En las plantas existe una enorme diversidad bioquímica de compuestos orgánicos conocidos como productos naturales o metabolitos secundarios, producto del metabolismo no esencial para el crecimiento normal, desarrollo o reproducción de un organismo (Harborne, 1993; Cheeke, 1995). Estos compuestos sirven para cumplir los requisitos secundarios de los organismos productores que les permite sobrevivir entre la competencia de especies, y proporcionar mecanismos defensivos para facilitar los procesos reproductivos, además han demostrado ser una fuente muy valiosa como antibacterianos, medicamentos contra el cáncer, agentes reductores del colesterol, inmunosupresores, agentes antiparasitarios y herbicidas (Preeti *et al.*, 2010).

En los años 1950, los metabolitos secundarios eran considerados como desechos metabólicos o productos de la desintoxicación (Peach, 1950; Reznik, 1960), afortunadamente en la actualidad los metabolitos secundarios ya no son considerados productos de desecho, sino componentes del metabolismo de la planta (Barz y Koster, 1980), que pueden fabricar muchos tipos diferentes de metabolitos secundarios, que han sido explotados por los seres humanos, ocupando un papel importante en una amplia gama de aplicaciones ( Balandrin *et al.* , 1985 ).

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato, donde una síntesis constitutiva y específica de los metabolitos secundarios puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular pero también existen metabolitos secundarios que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999), esta síntesis depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico, en general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides y sesquiterpenos se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminos y alcaloides tiene lugar en la mitocondria (Wink, 1999).

Existen tres grandes categorías de los metabolitos secundarios de las plantas como terpenoides, alcaloides, y compuestos fenólicos (Croteau et al., 2000). Un ejemplo de ello son los compuestos de naturaleza triterpénica conocidos como Cucurbitacinas donde las plantas que las contienen se usan en la medicina tradicional por su actividad antipirética, analgésica, antiinflamatoria, antimicrobiana, y antitumoral (Geissman, 1964; Chen, 2005).

## 1.2 Familia Cucurbitácea

A nivel mundial, la familia Cucurbitaceae incluye 118 géneros y 825 especies. En México, está representada por 141 especies y varias subespecies y variedades (incluyendo 13 que corresponden a plantas domesticadas), pertenecientes a 34 géneros de las dos subfamilias (Cucurbitoideae: calabazas, pepinos, sandías y Zanonioideae: pepinos silvestres y sandías de ratón) y de las cuales, cinco géneros y 70 especies son endémicos de México (sólo se encuentran en el país) (Lira et al., 2002). Las Cucurbitáceas son plantas rastreras o trepadoras, anuales o perennes, con flores de uno o ambos sexos. Sus tallos pueden ser muy delgados, parecidos a hierbas o bejucos o hasta muy engrosados y de aspecto leñoso. Las hojas tienen formas, posiciones y características muy variables, normalmente son pubescentes (que presentan tricomas, estructuras parecidas a vellosidades), principalmente en el haz, parte superior de la hoja, y rara vez en ambas superficies. Las flores normalmente son unisexuales, rara vez bisexuales y están dispuestas en posición axilar (en las uniones del tallo y las ramas) y pueden ser tanto solitarias como en racimos. La mayoría de las flores tienen cinco pétalos, pero pueden tener cuatro, tres o incluso más, la forma de las flores usualmente es acampanada y de colores variables. Los frutos son carnosos (en algunos casos secos y duros) y en forma de cápsula, baya o pepo (como las calabacitas). Pueden ser indehiscentes o dehiscentes (que se abran solos o no), lisos o cubiertos de espinas. Las semillas pueden ser una o muchas y estar en distintas posiciones dentro del fruto (Lira, 1996).

### 1.3 El género *Sechium* P.Brown

México es un país con gran riqueza biológica con cerca de 22 000 especies endémicas (Rzedowski, 1993). Es centro de origen y de domesticación de diversas especies cultivadas (66 a 102 especies) (Ortega-Pacza et al., 1998), algunas de ellas semi domesticadas y con una gran cantidad de parientes silvestres (Hernández, 1985; Rzedowski, 1995). *Sechium edule*, es una de estas especies, siendo México el país que cuenta con la mayor diversidad biológica del mundo (Ortega-Pacza et al., 1998). Actualmente se consideran sinónimos de *Sechium* a los siguientes taxones: *Sicyos edulis* Jacq., *Chayota edulis* Jacq., *Sechium americanum* Poir., *Cucumis acutangulus* Descourt y *Sechium chayota* Hemsley (Flores, 1989; Lira y Chiang, 1992; Becerra, 1996), y se acepta que en el género *Sechium* se encuentran diez especies, de las cuales ocho son silvestres: *S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*, y dos cultivadas: *S. tacaco* y *S. edule*, con una distribución desde Mexico hasta Panamá (Lira-Saade, 1996).

### **1.3.1 *Sechium edule* (Jacq.) Sw.**

*Sechium edule* pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, uno de los grupos de plantas con mayor número de especies con importancia económica y cultural.

Esta familia está constituida por 118 géneros y poco más de 825 especies, distribuidas principalmente en los trópicos y subtrópicos.

Las plantas de esta especie se caracterizan por ser rastreras o trepadoras, anuales o perennes, monoicas o dioicas; tallos herbáceos y delgados a muy engrosados y de aspecto leñoso, generalmente ramificados, angulosos, surcados, ocasionalmente rollizos; hojas alternas, pecioladas, láminas ovado-cordadas a suborbiculares, ocasionalmente reniformes, triangulares, sagitadas o astadas, simples y enteras a diversamente divididas, algunas veces folioladas, glabras a variadamente indumentadas, con frecuencia escabroso pubescentes, principalmente en el haz (rara vez en ambas superficies), por la presencia de abundantes tricomas cónicos, rígidos y de base multicelular, zarcillos laterales con respecto al pecíolo, simples o con un variado número de ramas, algunas veces rudimentarios; flores unisexuales o rara vez las pistiladas bisexuales, axilares, solitarias o dispuestas en fascículos, racimos, panículas, glomérulos o inflorescencias umbeloides, perianto 5-mero, algunas veces reducido a 4- mero o 3-mero u ocasionalmente con mayor número de partes, receptáculo o hipantio campanulado, urceolado, cupuliforme, cilíndrico o infundibuliforme; lóbulos del cáliz o sépalos triangulares, denticulares, ovadoelípticos, lanceolados, subulados o espatulados; corola inserta en el limbo del receptáculo, campanulada, gamopétala,

dividida casi hasta la base o hasta más o menos la mitad de su longitud total, normalmente actinomorfa, rara vez ligeramente zigomorfa, de color blanco, amarillo, verdoso, blanco-verdoso, amarillo-verdoso u ocre-verdoso, ocasionalmente anaranjado brillante, rosa o rojo; flores estaminadas con 5 estambres básicos, por lo general reducidos por la fusión parcial o total de los filamentos y/o las anteras, para aparecer como 4, 3, 2 o incluso 1, insertos en las paredes o en la base del receptáculo, filamentos libres o parcial a totalmente fusionados, anteras libres o fusionadas, nectarios y/o pistilodios a menudo presentes en la base del receptáculo; flores pistiladas coaxiales con las estaminadas o en axilas diferentes, perianto usualmente como el de las estaminadas, pero por lo general de diferentes dimensiones y con el receptáculo muy reducido y algunas veces con distinto número de partes, ovario ínfero, usualmente 3-carpelar, placentación parietal, óvulos anátropos, uno o muchos, estilos 1 a 3, generalmente unidos, rara vez libres, estigmas comúnmente tantos como carpelos en el ovario, algunas veces fusionados e indiferenciados, nectarios, estaminodios o estambres rudimentarios con frecuencia presentes; frutos de tipo baya, pepo, anfisarca, rara vez capsulares o samaroides, indehiscentes o dehiscentes, glabros e inermes a diversamente indumentados y/o armados, mesocarpo carnoso, jugoso, fibroso-reticulado a seco y muy reducido o algunas veces cartilaginoso a leñoso y formando cámaras o celdas que contienen las semillas; éstas una o muchas, en posición horizontal, ascendente o péndula, usualmente inmersas en el mesocarpo, algunas veces envueltas por una estructura de tipo de arilo, comprimidas a tumescentes, con o sin bordes

diferenciados en color y textura del centro de la semilla, algunas veces angostamente aladas, testa generalmente rígida, lisa o diversamente ornamentada (Lira-Saade, 2001).

### **1.3.2 Diversidad genética de *Sechium edule***

La diversidad genética está directamente relacionada con la biodiversidad y tiene importantes efectos ecológicos, especialmente importantes para la sobrevivencia y adaptación de una especie; ya que permite responder a los cambios del ambiente que la rodean (Huges *et al.*, 2008). Pocas especies cultivadas despliegan la gran diversidad de formas, tamaños, ornamentación, armadura, indumento y colores como la que se encuentra en los frutos del chayote, además de la forma y venación de las hojas, color de ramas y sarcillos y tamaño de la flor. Esto se debe, a que *S. edule* es una planta de polinización cruzada; por lo que son comunes las cruces entre diferentes tipos, ya que no hay sincronización entre la antesis de las flores pistiladas y estaminadas (Cadena *et al.*, 2007; Avendaño *et al.*, 2010). Debido a esto, en los complejos infraespecíficos frecuentemente se observan altos niveles de variación, especialmente en especies que han sido altamente manipuladas por el hombre, como en el chayote, en el que la domesticación enfocada a mejorar el sabor, tamaño y forma de los frutos, ha contribuido a la conservación de una alta diversidad genética, dentro y entre los tipos cultivados (Bisognin, 2002). En Centroamérica se conocen más de 25 cultivares o tipos de

chayote que se diferencian por el tamaño, forma, color, espinas y cantidad de fibra en el endocarpo del fruto. La coloración del fruto varía desde crema hasta verde oscuro y su forma aperada, redonda, ovoide, alargada, puede presentar espinas o ser completamente liso (Cadena *et al.*, 2007). En este contexto, Cadena *et al.* (2008) estudiaron la variación morfológica y anatómica de frutos y hojas de chayote en el Estado de Veracruz y encontraron que las clasificaciones fenotípicas, de acuerdo con las características típicas del chayote están relacionadas con cambios anatómicos y morfológicos dirigidos a mejorar la especialización adaptativa de los diferentes tipos de chayote y en coevolución con el hombre se han desarrollado los chayotes verdes y amarillos. Con base en estos trabajos, GISEM reconoce 12 variedades que se muestran en la Figura 1.

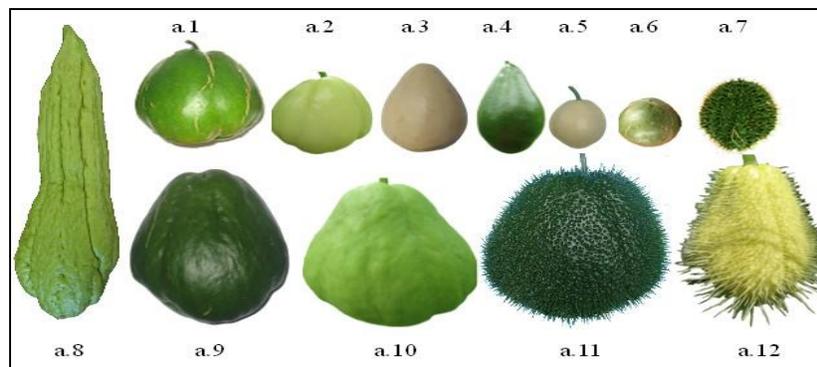


Figura 1. Grupos varietales de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (a1): *nigrum levis* (a2), *albus levis* (a3), *albus dulcis* (a4), *nigrum conus* (a5), *albus minor* (a6), *nigrum minor* (a7), *Sechium edule silvestre* (a8), *nigrum maxima* (a9), *nigrum xalapensis* (a10), *virens levis* (a11), *nigrum spinosum*, (a12), *albus spinosum* (Cadena-Liñiguez, 2008) Además de hibridaciones recientes, el grupo Interdisciplinario de investigación de *Sechium edule* en México (GISEM), detectó el linaje genético del híbrido H387-07- GISEM producto de los cruzamientos entre las variedades *Sechium edule* var. *virens levis* por *Sechium edule* var. *Amarus silvestris* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (GISEM, 2008).

### **1.3.3 Importancia alimenticia de *Sechium edule*.**

El género *Sechium* (P. Br.) ha basado su importancia alimentaria en las especies de *Sechium edule* y *Sechium tacaco* (Pitt.) C Jeffrey, los frutos de ambas especies y la raíz de la primera formaron parte de la dieta de las culturas precolombinas (Hernandez, 1985; Lira-Saade, 1996). De hecho el término “chayote” deriva de una modificación de dos vocablos náhuatl, “huitz” y “ayotl”, que significa “calabaza con espinas”, y que al castellanizarnos derivó en “Chayotl”, hasta el actual chayote.

A partir de la gran diversidad de tipos, formas, colores y sabores, esta especie es ampliamente reconocida y aceptada para la comida regional de pueblos originarios de México y Centroamérica. El naturalista europeo Francisco Hernández, quien vivió en México entre los siglos XV y XVI (Cook, 1901), fue uno de los primeros en escribir sobre la existencia del chayote.

Los frutos, raíces y tallos del chayote han formado parte importante de la alimentación de los habitantes de América y otras partes del mundo, pues se considera que el 80 por ciento de esta cucurbitácea es comestible. Es un ingrediente común en la gastronomía mexicana, actualmente su consumo tiene gran demanda debido a sus amplias propiedades nutricionales, que lo hacen ser una de las hortalizas que se incluyen en la mayor parte de dietas, por su bajo contenido de almidón, alto contenido de agua, bajo contenido calórico y presencia de potasio. Es un alimento alto en fibra, bajo en calorías y no tiene colesterol., el fruto y la semilla contienen aminoácidos, entre los cuales se encuentran: lisina,

histidinana, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, valina, isoleucina, serina, alanina y tirosina, por lo que son recomendados en dietas en hospitales (Gamboa, 2005).

### **1.3.4 Importancia farmacológica**

En la última década la preocupación relacionada con la salud y los alimentos ha hecho que el consumidor incluya en su dieta aquellos alimentos que le otorguen beneficio fisiológico y/o que tengan funciones nutrimentales que reduzcan el riesgo de alguna enfermedad. Estudios realizados con frutos y hojas de chayote han revelado actividad diurética (Jensen y Lai, 1986), antiinflamatoria e hipotensora, incluso como coadyuvante en la eliminación de cálculos renales. El chayote se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión, alivia la inflamación intestinal y cutánea, además de favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003). Contiene peroxidasas, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides y cucurbitacinas atribuyéndoles actividad antialérgica, antiinflamatoria, antiviral y efectos antitumorales (Jayaprokasam *et al.*, 2003; Setzer y Setzer, 2003; Siciliano *et al.*, 2004; Cadena- Iñiguez *et al.*, 2005, 2007). En las variedades de *S. edule* se han identificado diversos metabolitos principalmente cucurbitacinas, con propiedades antineoplásicas en fibrosarcoma de pulmón de ratón, leucemia y cáncer cérvico-uterino específicamente en las líneas celulares HeLa (humana), L-929 y P-388, por lo que

con estas características es de suma importancia promover la conservación de estas variedades (Cadena *et al.* 2006), Así como Monroy-Vázquez *et al.* (2009), reportaron que un extracto alcohólico de frutos de *S. edule* var. *nigrum spinosum* presenta la posibilidad de detener la proliferación de células cancerígenas. Así como otras propiedades se indican en el Tabla 1.

*Tabla 1. Efectos farmacológicos de Sechium edule.*

<b>Tipo de extracto</b>	<b>efecto</b>	<b>Fuente</b>
Extracto en metanol	Antiinflamatorio cardiotónico	Salama <i>et. al.</i> , 1986
B-sitoesterol-β-D-glucopiranosido estigmasterol-B-D- glucopiranosido	Antiinflamatorio	Salama <i>et. al.</i> , 1987
Proteína “sechiumina” de extracto acuoso de semilla	Inactivación ribosomal Agente quimioterapéutico	Wu <i>et. al.</i> , 1998
Extracto en metanol y acuoso	Antioxidante	Ordoñez <i>et. al.</i> , 2006
Extractos crudos de ocho tipos biológicos	Antiproliferativo sobre L929 , P-388 y HeLa	Cadena-Iñiguez <i>et. al.</i> , 2013

Sin embargo, se han encontrado diferencias en actividad antiproliferativa entre los grupos varietales *S. edule*, reportados por Cadena-Lñiguez *et. al.*, 2005, 2007, 2013 esto como posible consecuencia de las diferencias en los fenotipos y genotipos de las tres líneas celulares o de las diferencias en cuanto a los compuestos presentes en cada fruto. Además, las concentraciones de metabolitos son fuertemente influenciados por las condiciones ambientales (Jennings y Trewavas, 1986) afectando a la biogénesis de metabolitos relacionados a la eficiencia fisiológica (Spalding, 2003).

#### **1.4 Cáncer**

El cáncer no es una sola enfermedad, sino el nombre aplicado a una gran variedad de tumores malignos que se forman por crecimiento descontrolado de las células. Todos los órganos del cuerpo están formados por células. Normalmente las células se dividen para formar nuevas células solo cuando el cuerpo lo necesita. Si las células se dividen cuando no se necesita su proliferación, se genera una masa denominada neoplasia o tumor. Los tumores pueden ser benignos (no cancerígenos) o malignos (cancerígenos). Las células de los tumores malignos pueden invadir y dañar órganos y tejidos vecinos. Algunas células cancerígenas pueden salir del tumor maligno y viajar por el torrente sanguíneo formando nuevos tumores en otras partes del cuerpo, a esto se le

conoce como metástasis (American Cancer Society, 2013), así mismo está enfermedad es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis) (OMS, 2011).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS], 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas, aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013).

## 1.5 Cáncer de mama

El cáncer de seno (mama) es un tumor maligno que se origina en las células del seno.

Esta enfermedad ocurre casi por completo en las mujeres, pero los hombres también la pueden padecer (American Cancer Society, 2013). Existen muchos tipos de cáncer de seno, pero algunos de ellos ocurren muy pocas veces. Algunas veces un tumor del seno puede ser una mezcla de estos tipos o ser una combinación de los tipos *in situ* e invasivo.

## 1.6 Carcinoma ductal in situ (DCIS)

DCIS significa que las células anormales se originan en las células que revisten los conductos sin crecer (invadir) a través de las paredes de los conductos hacia el tejido del seno. Debido a que no han crecido a través de la pared de los conductos, estas células no se pueden propagar a los ganglios linfáticos ni a otros órganos. No obstante, a veces el DCIS puede progresar hasta convertirse en un cáncer invasivo. Por esta razón, a veces se le identifica como un *pre cáncer*. Algunas veces también se le llama cáncer de seno *no invasivo*. Casi todas las mujeres que tienen cáncer en esta etapa logran una cura completa. Los mamogramas encuentran muchos casos de DCIS.

### **1.7 Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante) (IDC)**

Es el cáncer de seno más común. Comienza en las células que revisten un conducto, penetra a través de la pared del conducto e invade el tejido del seno. Desde ese lugar pueda propagarse (hacer metástasis) a los ganglios linfáticos cercanos o a otras partes del cuerpo. El IDC es responsable de aproximadamente ocho de cada 10 casos de cáncer invasivo del seno.

### **1.8 Carcinoma lobulillar invasivo (infiltrante) (ILC)**

Este cáncer comienza en las células que revisten a las glándulas mamarias (lobulillos). Las células crecen a través de la pared de los lobulillos. Desde allí, las células cancerosas se pueden propagar (hacen metástasis) a los ganglios linfáticos cercanos o a otras partes del cuerpo. Aproximadamente 1 de 10 casos de cáncer invasivo del seno son de este tipo.

## **1.9 Cáncer inflamatorio del seno (IBC)**

Este tipo de cáncer invasivo del seno no es común. A menudo, no se presenta una sola protuberancia o tumor, sino que este cáncer hace que la piel del seno luzca rojiza y se sienta acalorada. El cáncer inflamatorio de seno también puede hacer que la piel se haga más gruesa y presente hoyuelos. Puede que el seno se vuelva más grande, duro, sensible o que sienta picazón. En sus etapas iniciales, este tipo de cáncer de seno a menudo se confunde con una infección. Debido a que no hay una masa definida, es posible que no aparezca en un mamograma, lo que hace que sea aún más difícil detectarlo temprano. Este cáncer tiene una mayor probabilidad de propagación y un peor pronóstico que el cáncer ductal invasivo o lobulillar invasivo (American Cancer Society, 2013).

## **1.10 Estadísticas del cáncer de mama a nivel mundial.**

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres a nivel mundial, pues representa 16% de todos los cánceres femeninos y, aunque este padecimiento está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría de las defunciones por esta causa se registran en los países en desarrollo, (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004).

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60%

aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Coleman *et al.*, 2008).

### **1.11 Cáncer de mama en México**

En México durante 2010, se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico son el cáncer de mama (24.3%), el cervicouterino (9.7%) y el de colon (3.2 %), en lo cual, la tasa de morbilidad hospitalaria más alta es debida a cáncer de mama, afecta principalmente a las mujeres de 60 a 64 años y a las de 50 a 59 años (158 y 156 de cada 100 mil mujeres de cada grupo de edad, respectivamente), este representa las principales causas de morbilidad hospitalaria; para el caso del de mama, el grupo de edad que concentra el mayor número de casos es el de 50 a 59 años (29.8%), le sigue el de 40 a 49 años (27.8%)(INEGI, 2010).

En cuanto al porcentaje de defunciones en la población femenina de 20 años o más, las principales causas son: el cáncer de mama (13.8%), por cervicouterino (10.4%) y de estómago (7 %) (INEGI, 2010).

## **1.12 Tratamientos para el cáncer y efectos secundarios**

Los tipos principales de tratamiento para el cáncer de mama se clasifican en cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida, terapia dirigida a los huesos, estos pueden ser clasificados en grupos amplios, basándose en cómo funcionan y cuándo son usados (American Cancer Society, 2013).

Desafortunadamente estos tratamientos dan como consecuencia diversos efectos secundarios como son cansancio, náuseas, vómito, dolor, linfedema (inflamación del brazo, seno y pecho), sensibilidad e infecciones en heridas, pérdida de cabello, ulceración en la boca, pérdida o aumento de apetito, baja en glóbulos rojos y blancos, afectación a células productoras de sangre de medula ósea, entre otros (American Cancer Society, 2013).

## **1.13 Plantas medicinales: alternativa viable para el tratamiento contra el cáncer.**

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas, posee una gran variedad de plantas útiles para el hombre: plantas que producen medicinas, combustibles, vestimenta, refugio, o satisfacen necesidades culturales (CONABIO, 1998).

Las plantas medicinales han demostrado tener importantes aplicaciones en la medicina moderna consideradas fuente directa de agentes terapéuticos o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos (Oliveira *et al.*, 2005), la OMS las ha definido como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos, de las cuales se ha estimado que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud (Farnsworth *et al.*, 1985). En la actualidad el desarrollo de tratamientos e investigación para el cáncer ha sido espectacular. Se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas (Couffignal *et al.*, 2000); compuestos promisorios, como vincristina, paclitaxel y etopósidos, de los cuales algunos fueron obtenidos de plantas como son: Vincapervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus*, de la cual se descubrió que los alcaloides de la vinca, vincristina, vinblastina y sus derivados semisintéticos tenían efectos anticancerígenos (Malikov *et al.*, 1977; Johnson., 1968), *Camptotheca acuminata Decne*, conocida como el “árbol de la felicidad” en China de la que se aisló camptotecina, (Haaz *et al.*, 1998; Rosing *et al.*, 1998) y el paclitaxel aislado de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*) en 1969 (Wani, 1971).

## 2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

### 2.1 Enfoque científico

Se ha observado que los extractos de algunos genotipos de *Sechium edule* tienen actividad antiproliferativa, dentro de estos genotipos se registra al híbrido H387-07 que presenta un efecto en antiproliferativo sobre las líneas celulares WEHI-3, HeLa, L929, P388 y J774; pero se desconoce si este híbrido tiene efecto inhibitorio sobre la línea celular MCF7 (cáncer de mama), y si los genotipos emparentados al híbrido H387-07, poseen el mismo potencial inhibitorio.

### 2.2 Enfoque social

De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de medio millón de mujeres murieron en 2011 a causa del cáncer de mama, siendo una enfermedad que va en aumento en México, y que tan solo en la última década incremento 14% su mortalidad, afortunadamente en la actualidad las plantas son una alternativa viable para el tratamiento de esta enfermedad.

### **2.3 Enfoque económico**

Su costo es un duro impacto para las finanzas personales de la mujer que lo padece, por ejemplo las radioterapias, que es el segundo paso, donde la paciente recibirá radiaciones para detener el crecimiento de las células cancerígenas, el costo oscila entre 30,000 y 35,000 pesos por un ciclo de 20 sesiones. Además será necesario que la paciente tome medicamentos para calmar el dolor, las náuseas y el vómito a consecuencia del tratamiento, con un costo desde 150 hasta 5,000 pesos mensuales, siendo una enfermedad que puede combatirse de uno a tres años, pero las pacientes deben llevar un tratamiento que incluya medicamentos y análisis durante los cinco años posteriores para monitorear que la enfermedad no vuelva a aparecer.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa de cuatro genotipos de *Sechium edule* sobre células de cáncer de mama (línea MCF7), e identificar los principales compuestos responsables de dicha actividad a través de un estudio biodirigido.

#### 3.2 Objetivos específicos

- i. Obtención de extractos crudos en metanol de los genotipos de *Sechium edule* amargo 290, madre negra, H387-07 y HD 369-12.
- ii. Obtención de rendimientos de extractos crudos en metanol
- iii. Identificación de metabolitos secundarios de los cuatro genotipos de *Sechium edule*
- iv. Evaluación la actividad antiproliferativa de los extractos crudos sobre las líneas tumorales.
- v. Obtención de IC<sub>50</sub> de extractos crudos en metanol.

- vi. Obtención de extractos en hexano, diclorometano y metanol de los genotipos de *Sechium edule* amargo 290, madre negra, H387-07 y HD 369-12.
- vii. Obtención rendimiento de extractos en Hexano- Diclorometano y Metanol
- viii. Identificación de terpenos y flavonoides por cromatografía en capa fina de cada extracto proveniente de cada extracción selectiva en hexano, diclorometano y metanol.
- ix. Evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos en hexano, diclorometano y metanol.
- x. Obtención de IC<sub>50</sub> de los extractos en hexano, diclorometano y metanol.
- xi. Fraccionamiento de los extractos obtenidos con mayor actividad antiproliferativa.
- xii. Evaluación de la actividad inhibitoria de las diferentes fracciones obtenidas.
- xiii. Identificación de la composición química de la fracción activa por medio de un análisis de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Se utilizaron cuatro tipos de frutos en madurez hortícola cortados a los  $18 \pm 2$  días después de antesis (Cadena- Iñiguez *et al.*, 2007), proporcionados por el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISEM).

### 4.2 Variables

Las variables a evaluar fueron cuatro genotipos pertenecientes a *Sechium edule*: Madre negra-GISEM, Amargo 290-GISEM, H-387-07-GISEM y HD-369-12-GISEM

Tabla 2.

Tabla 2. Genotipos de frutos de *Sechium edule*.

<b>PADRES</b>	<b>HÍBRIDOS</b>
Madre negra-GISEM	H-387-07-GISEM
Amargo 290-GISEM	HD-369-12-GISEM

### **4.3 Extracción de metabolitos secundarios**

#### **4.3.1 Preparación de material**

Los frutos fueron cosechados en madurez, se cortaron en pequeños trozos, secados a 40°C con circulación de aire hasta su deshidratación. Finalmente fueron molidos para estandarizar tamaño de partícula.

#### **4.3.2 Análisis preliminar de compuestos principales.**

Se evaluó el contenido de los principales grupos de metabolitos secundarios en los genotipos Madre negra, Amargo 290, H387-07 y HD369-12.

Para preparar los extractos, se colocó en un equipo de refracción los cartuchos con 10 gramos de la muestra seca- molida adicionando el disolvente metanol para la obtención del extracto crudo y agua en el caso del extracto acuoso, se dejó en un tiempo de extracción aproximado de 72 horas.

Una vez obtenido el extracto, se filtró y fracciono 1 mL de cada extracto en tubos del No. 1 por prueba.

Tubo 1: alcaloides

Se adiciono cinco gotas del reactivo Dragendorf a 1mL de cada extracto.

Tomando como positivo al observar una presencia de precipitado marrón.

Tubo 2: saponinas

Esta prueba se realizó únicamente a los extractos acuosos, se agito por dos minutos en el vortex el tubo con el contenido del extracto acuoso, la formación de abundante espuma durante 5 minutos se considera como prueba positiva.

Tubo 3: flavonoides

Se adiciona a 1mL del extracto un trocito de cinta de magnesio y 1mL de ácido clorhídrico (HCL) concentrado, la formación de espuma rojiza es indicativo de la presencia de flavonoides.

Tubo 4: aceites esenciales

Se observó directamente en los tubos con extracto si existía la presencia de pequeñas gotas de aceite flotando y olor agradable.

Tubo 5: taninos

Se adiciono a 1mL del extracto dos gotas de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ); agitando para observar si ocurre la formación de un color violeta indicativo de la presencia de estos compuestos.

Tubo 6: terpenos

Se evaporó el metanol y agua de los extractos, se agregó diez gotas de  $\text{CHCl}_3$  (Cloroformo) + cuatro gotas de  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$  (anhídrido acético) y dos gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico concentrado), la presencia de coloración rosa-violeta es indicativo de presencia.

Los resultados positivos se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) de la siguiente manera:

Saponinas: Se utilizó una fase móvil: cloroformo-acetato de etilo-  $\text{H}_2\text{O}$  (0.6:0.3:0.1:0.6), revelando con el agente cromogénico vainillina +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Taninos: Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético-  $\text{H}_2\text{O}$  (1:0.1:0.1:0.2), revelador cromogénico  $\text{FeCl}_3$ .

Terpenos: Fase móvil: acetato de etilo- metanol (0.7:0.3), revelado con vainillina-  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Flavonoides: Fase móvil: acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético-  $\text{H}_2\text{O}$  (1:0.1:0.1:0.2), revelado con Natural Product /Polietilenglicol (NP/PEG).

#### **4.3.3 Preparación de extractos crudos en metanol y por extracción selectiva en hexano- diclorometano y metanol)**

Se pesó 100 gramos de cada una de las 4 muestras de los genotipos, se llevó a cabo una extracción discontinua, que consistió en reposar el macerado en metanol por 48 horas a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2.2$ ), para después decantar y filtrar, renovando el disolvente, hasta agotar los componentes solubles, después de la decantación y filtración se evaporó el disolvente a presión reducida (Rotavapor Büchi, R, 114, Suiza) a  $45^{\circ}\text{C}$ , hasta obtener un extracto crudo. Los extractos se mantuvieron en la campana de flujo laminar hasta evaporar algún residuo de solvente y finalmente calcular su porcentaje de rendimiento.

Los extractos por extracción selectiva se obtuvieron al pesar 500 gramos de cada una de las 4 muestras de los genotipos para posteriormente realizar el mismo proceso indicado anteriormente sustituyendo los disolventes a hexano, diclorometano y metanol, el cambio de solvente se realizó hasta agotar color.

#### 4.4 Identificación de terpenos y Flavonoides

Se utilizó a los extractos provenientes de la extracción selectiva con hexano, diclorometano y metanol para ser analizados por cromatografía en capa fina y confirmar la presencia de terpenos y flavonoides.

Para la identificación de terpenos se utilizó a los extractos en hexano y diclorometano, donde se adiciono a estándares como cucurbitacina B, cucurbitacina D, cucurbitacina I y cucurbitacina E, se usó como fase móvil diclorometano-metanol (19:2) y el revelado primero con luz-UV a 254 y 365 nm y después con el agente cromogénico vainillina-ácido sulfúrico al 50% y se llevó a 110°C por 5 minutos.

En el caso de la identificación de flavonoides solo se utilizó el extracto en metanol usando como eluyente acetato de etilo-acido fórmico- ácido acético- H<sub>2</sub>O (12.5:1.3:1.3:3.2) y Natural Product /Polietilenglicol (NP/PEG) como revelador.

## **4.5 Fraccionamiento de extractos e identificación de fracciones activas**

### **4.5.1 Fraccionamiento por CCF del extracto H387-07 en hexano**

Para el fraccionamiento del extracto activo H387-07 se realizó una técnica de cromatografía la cual consistió en preparar doce placas preparativas de sílica gel (Sílica gel Kiesel 60 GF) de 20 x 20 cm, se aplicó en banda 20 mg del extracto, utilizando como fase móvil Hexano- acetato de etilo (60:40), se observó en luz-UV a 254/360 nm y se detectó a las bandas de interés.

El raspado de bandas de interés fue de acuerdo con su factor de retención (Rf), al total de cada una de estas se les adiciono hexano-acetato de etilo (12.5:12.5) en un total de 25 mL, poniendo en agitación durante una hora, después se centrifugo a 4000 rpm por 5 minutos, el residuo de sílica se eliminó, se evaporo solvente del sobrenadante, para pesar y obtener el rendimiento de fracciones.

Se obtuvo seis fracciones totales, adicionando la fracción del punto de aplicación llamada fracción cero, se monitoreo por CCF utilizando una fase móvil de Hexano-acetato de etilo (16:4) y estándares de cucurbitacinas, el revelado se hizo con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 110 °C por 5 minutos.

#### **4.5.2 Fraccionamiento por columna (CC) de extracto Madre Negra en diclorometano**

Se fracciono 12.7 g del extracto en diclorometano del genotipo Madre negra, por cromatografía en columna (CC) a baja presión. El extracto se diluyó con un poco de disolvente y gel de sílice Kiesegel 60 (0.063-0.200nm) Merck. La columna se empaco con gel de sílice 60GF254 Merck, y se eluyó con diferentes proporciones de hexano-acetato de etilo (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10), y finalmente con metanol para agotar por completo la columna.

Se obtuvieron 92 fracciones las cuales fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF), reducidas a 8 fracciones totales por identidad cromogénica.

#### **4.5.3 Identificación de compuestos activos del extracto en diclorometano por CCF de la variedad Madre Negra**

La identificación por CCF consistió en fraccionar nuevamente las fracciones activas tres y cinco, debido a la riqueza en su composición, se utilizaron placas preparativas de sílica gel (Sílica gel Kiesel 60 GF) de 20 x 20 cm, se aplicaron en banda con 20 mg cada una; se usó hexano-acetato de etilo (10:90) como sistema de separación, se detectó la composición con luz-UV a 300 nm, se rasparon las bandas de interés de acuerdo con su factor de retención (Rf), y finalmente a cada una de éstas se les adicionó hexano-acetato de etilo (1:1), y se dejaron en

agitación durante una hora; posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por cinco minutos, se desechó el residuo de sílica de las muestras, se filtró el sobrenadante y evaporó el disolvente. Una vez evaporado el disolvente y obtenido su rendimiento se realizó otro análisis de CCF de las fracciones resultantes, en la placa se colocaron estándares de cucurbitacina I, E, B y D, la fase móvil consistió en hexano-acetato de etilo (10:90), y el revelado se hizo con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 110 °C por 5 min.

#### **4.5.4 Identificación de compuestos activos de Madre negra en diclorometano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Se pesaron 2 mg de las fracciones tres y cinco del genotipo de Madre negra-GISeM polaridad diclorometano y de estándares de cucurbitacinas I, B, E y D en tubos Eppendorf de 2mL, se adicioneo acetato de etilo- hexano en proporción (9:1) con un total de 1mL, se agito vigorosamente en el vortex, tomando con una jeringa cada una de las fracciones y estándares diluidos para inyectarlas en los viales filtrando con acrodiscos de Nylon membrane, de tamaño 25 mm, con un poro de 0.45 µm. Finalmente se realizó el análisis por HPLC.

La columna utilizada para este análisis fue Symmetry Shield RP18 (4.4 X 250 mm), 5 µm, la fase móvil fue de H<sub>2</sub>O, Metanol y acetonitrilo en proporciones (50:30:20), a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, y una presión de 179 bares a 25 °C de temperatura, se inyectó 20 µL de cada muestra.

Se determinó la absorbencia de las distintas muestras a 235 nm.

#### **4.4 Material celular**

La primera línea celular humana de cáncer de mama en 1958 (Lasfargues *et al.*, 1958), desde ese entonces se han establecido muchas líneas celulares. La línea celular de cáncer de mama por antonomasia es la MCF7, desarrollada en 1973 a partir de un derrame pleural de un carcinoma de mama humano (Soule *et al.*, 1973).

##### **4.4.1 Cultivo de línea celular**

La línea celular se obtuvo del ATCC (American Type Culture Collection), se cultivó con IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco BRL NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL NY, USA) al 10%, manteniéndose a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturante, con resiembra cada 48 h.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la proliferación celular se usó una densidad celular de 570 000 cel/mL para el caso de los ensayos con extractos crudos en metanol, en el caso de los extractos por polaridad y fracciones se utilizó una densidad de 30,000 cel/mL de MCF7. Las células se mantuvieron en cultivo durante 72 h en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA) en las condiciones ya mencionadas. Se estimularon con extractos crudos, por polaridad y fracciones a diferentes concentraciones en ug/mL, empleando como controles la adición de un vehículo y además 5 µL de Doxorrobicina como control positivo de inhibición de proliferación.

#### **4.4.2 Dilución de extractos**

Se pesó 0.0712 gramos de los cuatro extractos en metanol y los extractos en polaridad (hexano y diclorometano) Madre negra y H387-07 un tubo Eppendorf, se adiciono 40  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% agitando en vortex a 5' a 200 rpm., 200  $\mu\text{L}$  de PBS (Suero Fetal Bovino), se volvió a agitar en vortex para posterior agregar otros 750  $\mu\text{L}$  de PBS para agitar por última vez y centrifugar, el sobrenadante se pasó a otro Eppendorf mismo que se nombró stock 1. Los stocks 2, 3, y 4 fueron obtenidos de la siguiente manera:

Stock 2: 200  $\mu\text{L}$  del stock 1 + 400  $\mu\text{L}$  de PBS.

Stock 3: 12.5  $\mu\text{L}$  del stock 2 +  $\mu\text{L}$  de PBS.

Stock 4: 50  $\mu\text{L}$  del stock 3 + 750 de PBS.

#### **4.4.3 Evaluación de la proliferación celular**

Las células se mantuvieron en cultivo por 72 horas en las condiciones ya mencionadas, se evaluó la proliferación con la técnica de Cristal Violeta (Gillies et al., 1986). Esta técnica se utilizó dado que dicho colorante se adhiere a las bases nitrogenadas del DNA nuclear. Primero se fijó a las células con 50  $\mu\text{L}$  pozo<sup>-1</sup> de glutaraldehido 1%, se dejó en reposo por una o dos horas, posteriormente se decantó y adiciono 50  $\mu\text{L}$  pozo<sup>-1</sup> de Cristal violeta, se retiró el exceso de colorante con enjuagues de agua destilada, después se agregó ácido acético al 10% y se

mantuvo en agitación durante 20 minutos para solubilizar el colorante incorporado a las células; por último se leyó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria).

#### **4.4.4 Obtención de IC<sub>50</sub> de extractos**

Con ayuda de la ecuación de regresión lineal se determinó la concentración inhibitoria media de la proliferación (IC<sub>50</sub>) de cada uno de los extractos para disminuir aproximadamente el 50% de la densidad celular de la línea de cáncer de mama MCF7 con respecto al vehículo.

#### **4.4.5 Análisis estadístico**

Los experimentos fueron realizados al menos tres veces de manera independiente por cuádruplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey y Dunnett ( $P < 0.05$ ) para obtener el nivel de significancia empleando el programa SPSS versión 11.0

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de extractos crudos e identificación de principales compuestos secundarios

Del material seco y molido de los cuatro genotipos se realizaron extracciones discontinuas con metanol hasta agotar color, lo cual dio por resultado un extracto al cual se le nombro extracto crudo.

El rendimiento de los extractos crudos fue mayoritario en los progenitores Madre negra con un porcentaje del 17.07 %, después Amargo 290 con 13.68%, seguido de los híbridos HD369-12 con 7.55% y finalmente el H387-07. Lo anterior muestra que de los extractos obtenidos de los progenitores, se obtiene una mayor cantidad de extracto en comparación con los híbridos (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento de extractos crudos de frutos de los cuatro genotipos de *Sechium edule*: Madre negra, Amargo 290, HD369-12 y H387-07

<b>Rendimientos del extracto crudo en metanol de cuatro genotipos de <i>Sechium edule</i></b>		
Genotipos	Peso de material seco (gramos)	Extracto crudo %
Madre negra- GISeM	100	17.07
Amargo 290-GISeM	100	13.68
HD 369-12-GISeM	100	7.55
H 387-GISeM	100	6.66

En la identificación de metabolitos secundarios, se observó la presencia de terpenos, flavonoides, saponinas y taninos, no se detectó presencia de alcaloides y aceites esenciales (Tabla 4) tomando en cuenta sus características cualitativas, confirmando el contenido de saponinas, triterpenos reportados por Salama *et al.*, 1986 y flavonoides (Siciliano *et al.*, 2004), así como la presencia de taninos, reportada en el genotipo H387-07 por Aguiñiga, 2013, con la confirmación de presencia de este tipo de compuesto en los genotipos emparentados con el híbrido pertenecientes al grupo varietal de *Sechium edule* indicado por Cadena- Iñiguez, 2005.

Tabla 4. Metabolitos secundarios presentes en extractos crudos de frutos de cuatro genotipos de *Sechium edule*.

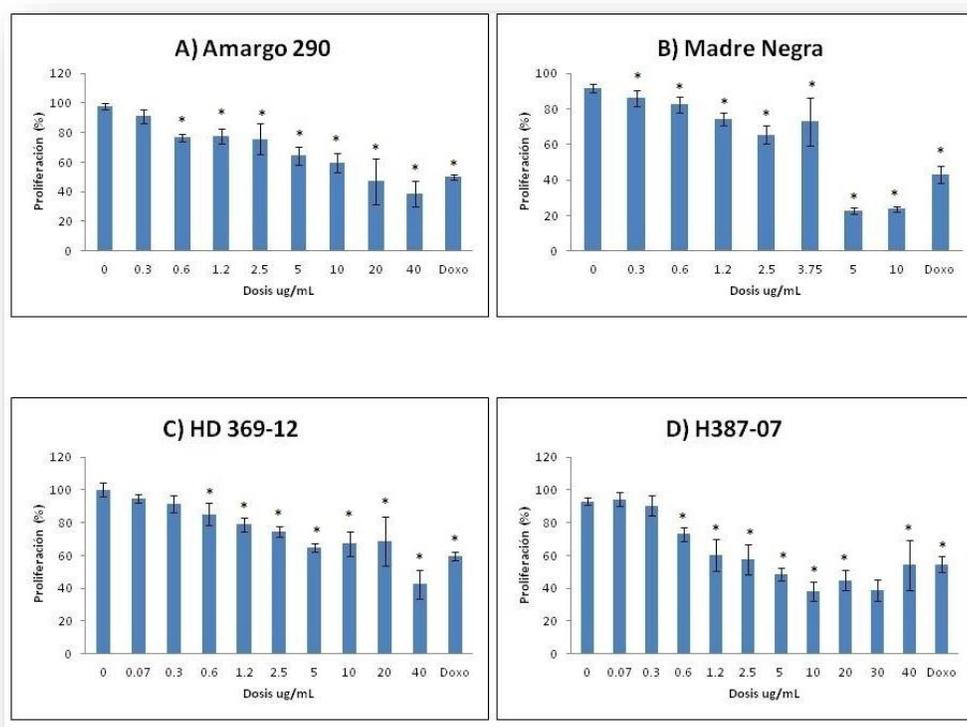
Compuesto secundario.	M. negra- GISEM	Amargo 290- GISEM	H- 387-07- GISEM	HD 369-12- GISEM
Terpenos	+++	+++	+++	+++
Flavonoides	+++	+++	+++	+++
Saponinas	+++	+++	+++	+++
Taninos	+++	+++	+++	+++
Alcaloides	----	----	---	---
Aceites esenciales	----	----	----	----

(---) No presencia; (++) Presencia

## 5.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa e IC<sub>50</sub> de extractos crudos

Los genotipos en extracto crudo de *Sechium edule*, presentaron actividad antiproliferativa con un efecto significativo sobre la línea celular de cáncer de mama (MCF7) a partir de 0.6 ug/mL para el caso de los genotipos de Amargo 290, HD369-12 y H387-07, en el caso de Madre negra 0.3 ug/mL (Figura 2) se observó una actividad similar a la del antineoplásico Doxorubicina en las dosis 40 ug/mL en el caso de Amargo 290, 5 ug/mL en Madre negra, HD369-12 y H387-07.

Figura 2. Efecto antiproliferativo de extractos crudos A) Amargo 290, B) Madre negra, C) HD369-12 y D) H387-0, sobre cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey  $p < 0.05$ ).



La determinación de la  $IC_{50}$  fue un punto clave para el estudio biodirigido de los cuatro genotipos de *Sechium edule*, ya que permitió identificar a los genotipos que presentan una mejor actividad antiproliferativa.

En el caso de los extractos crudos la menor concentración inhibitoria media dentro de los padres fue el de Madre negra con 6.44 ug/mL, mientras que H387-07 con 9 ug/mL fue el mejor de los híbridos (Tabla 5).

Los resultados obtenidos por los extractos crudos fueron la base para llevar a cabo una extracción selectiva con solventes como hexano, diclorometano y metanol para ser probados sobre la línea celular de cáncer de mama y observar su actividad antiproliferativa.

Tabla 5. Concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de extractos crudos de los cuatro genotipos de *Sechium edule*, sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7.

<b>Genotipo (Tratamiento)</b>	<b><math>IC_{50}</math> ug/mL<sup>-1</sup></b>
Madre negra	6.44
Amargo 290	8.4
HD369-12	10.49
H387-07	9

### 5.3 Identificación de terpenos y flavonoides por cromatografía en capa fina (CCF)

Debido a los resultados obtenidos en el análisis preliminar, en los cuales se observó la presencia de terpenos y flavonoides, se decidió hacer una búsqueda de estos en los extractos provenientes de la extracción selectiva (Hexano, diclorometano y metanol). En el extracto en hexano, los genotipos presentaron diversas bandas de terpenos identificados por la coloración característica que va desde el color morado, violeta a marrón al ser revelados con vainillina/ácido sulfúrico al 50%, siendo notoria la relación con el estándar de cucurbitacina B (Figura 3) identificada en los cuatro genotipos (Tabla 6)

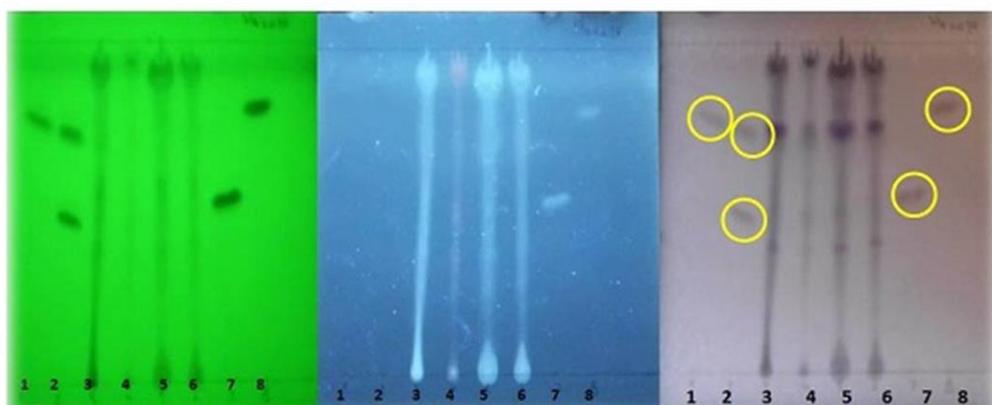


Figura 3. Identificación de terpenos de extractos en hexano, fase móvil Diclorometano-Metanol (19:2), Revelador vainillina/ácido sulfúrico al 50%, revelado a 110 °C. 1: Cucurbitacina B, 2: Cucurbitacina B y D, 3: Amargo 290-GISem, 4: Madre negra-GISem, 5: HD369-12-GISem, 6: H387-07-GISem, 7: Cucurbitacina I y 8: Cucurbitacina E.

Tabla 6. Índice de retención (rf) de extractos en hexano de cuatro genotipos de *Sechium edule*

<b>MUESTRA</b>	<b>RFS</b>	<b>COLOR</b>
Cucurbitacina B	0.76	Marrón
Cucurbitacina B y D	0.74/0.48	Marrón
Amargo 290	0.37	Lila
	0.74	Morado
	0.92	Gris
Madre negra	0.37	Lila
	0.72	Morado
	0.93	Gris
HD369-12	0.37	Lila
	0.72	Morado
	0.91	Gris
H387-07	0.38	Lila
	0.74	Morado
	0.90	Gris
Cucurbitacina I	0.51	Marrón
Cucurbitacina E	0.80	Marrón

Para el extracto en diclorometano se utilizó una fase móvil diclorometano-metanol (19:2), en el análisis se incluyó a los estándares de cucurbitacina B, I, D y E, y el revelado con vainillina-ácido sulfúrico al 50%, esta técnica permitió la identificación de terpenos como las cucurbitacinas (Figura 4).

La placa presento diversas bandas marrón, moradas y violetas, en las cuales se observó similitud entre los cuatro genotipos con los estándares de cucurbitacina B, D y E identificados por su valor de retención (rf) (Tabla 7).

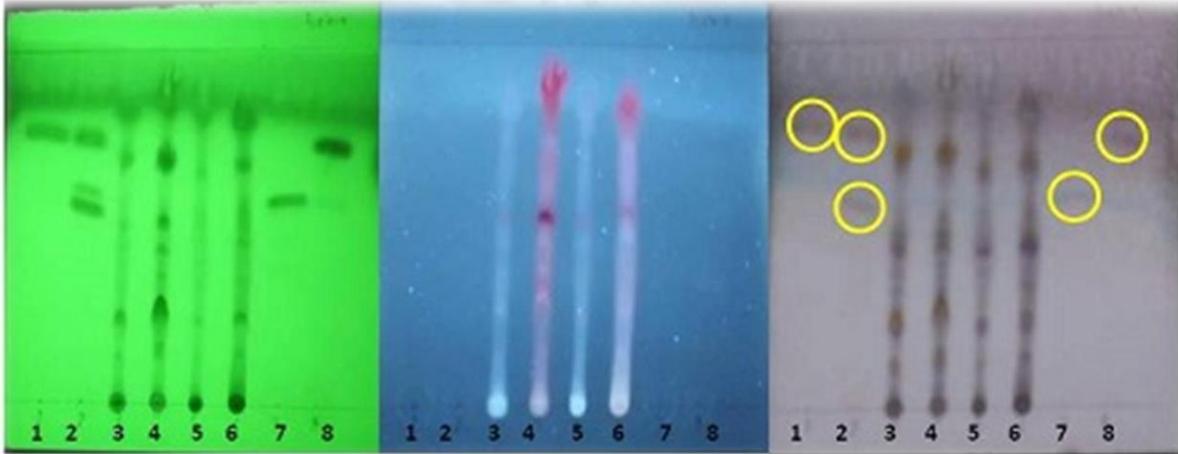


Figura 4. Identificación de terpenos en extractos de diclorometano, fase móvil Diclorometano-Metanol (19:2), Revelador vainillina-ácido sulfúrico al 50% 110 °C. 1: Cucurbitacina B, 2: Cucurbitacina B y D, 3: Amargo 290-GISeM, 4: Madre negra-GISeM, 5:HD369-12-GISeM, 6: H387-07-GISeM, 7: Cucurbitacina I y 8: Cucurbitacina E.

Tabla 7. Índice de retención de extractos en diclorometano de genotipos de *Sechium edule*.

<b>MUESTRA</b>	<b>RFS</b>	<b>COLOR</b>
Cucurbitacina B	0.76	Marrón
Cucurbitacina B y D	0.74 / 0.55	Marrón
Amargo 290	0.20	Morado
	0.42	morado tenue
	0.64	Violeta
	0.35	Marrón
Madre negra	0.64	Violeta
	0.43	Morado
	0.15	Violeta
HD369-12	0.62	Morado
	0.42	Morado
H387-07	0.64	Violeta
	0.42	Violeta
	0.21	Violeta
Cucurbitacina I	0.80	Marrón
Cucurbitacina E	0.73	Marrón

En el extracto en metanol se usó como fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-H<sub>2</sub>O (12.5:1.3:1.3:3.2) y revelado con Natural Product /Polietilenglicol (NP/PEG) con el cual se identificó la presencia de flavonoides (Figura 5).

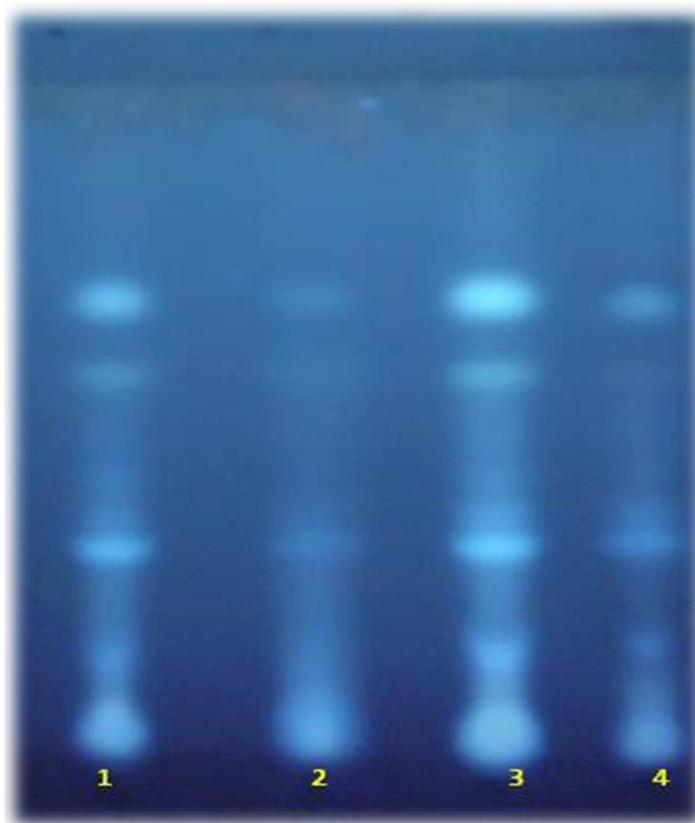
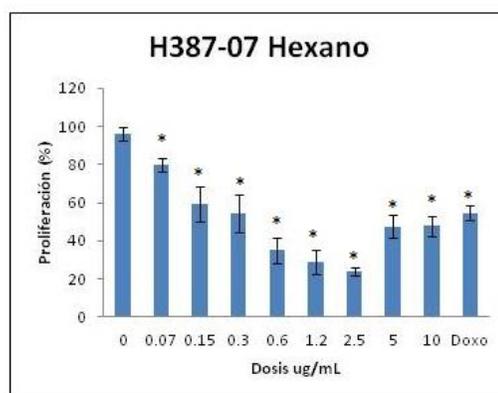
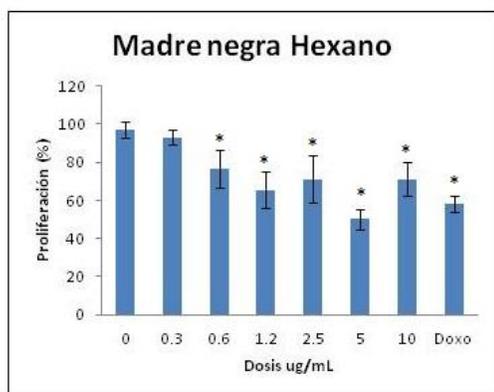


Figura 5. Identificación de Flavonoides de extractos en metanol, fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-H<sub>2</sub>O (12.5:1.3:1.3:3.2), Revelador NP/PEG 1: Amaro 290-GISeM 2: Madre negra-GISeM 3: HD369-12-GISeM 4: H387-07-GISeM.

#### 5.4 Comparación de la actividad antiproliferativa y obtención de IC<sub>50</sub>: extractos-genotipos

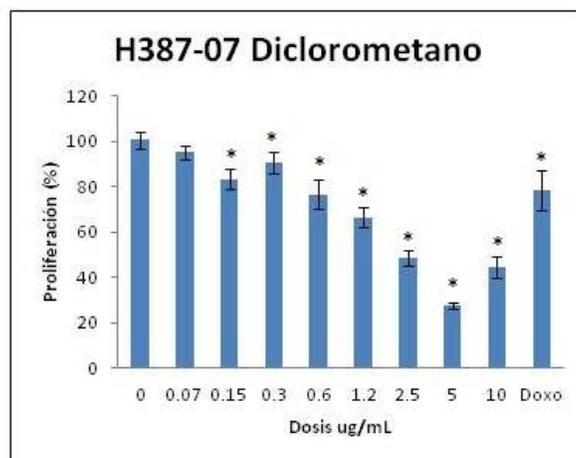
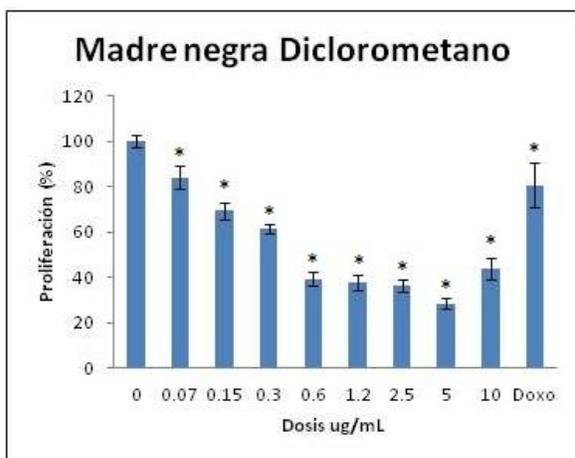
Debido a los resultados obtenidos en los ensayos con extractos crudos, se realizó la evaluación de actividad antiproliferativa en los extractos selectivos por polaridad (hexano, diclorometano y metanol) de los genotipos Madre negra y el Híbrido H387-07 los cuales presentaron una mejor actividad, determinada por su concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>). En los ensayos con extractos en hexano el genotipo H387-07 presentó efecto significativo desde la dosis más bajas de 0.07 ug/mL en comparación con Madre negra que fue de 0.6 ug/mL, H387-07 presentó un efecto mayor desde concentraciones medias comparadas con el antineoplásico usado (Figura 6).

Figura 6. Efecto antiproliferativo de extractos en hexano de Madre negra y H387-07, sobre cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey p<0.05).



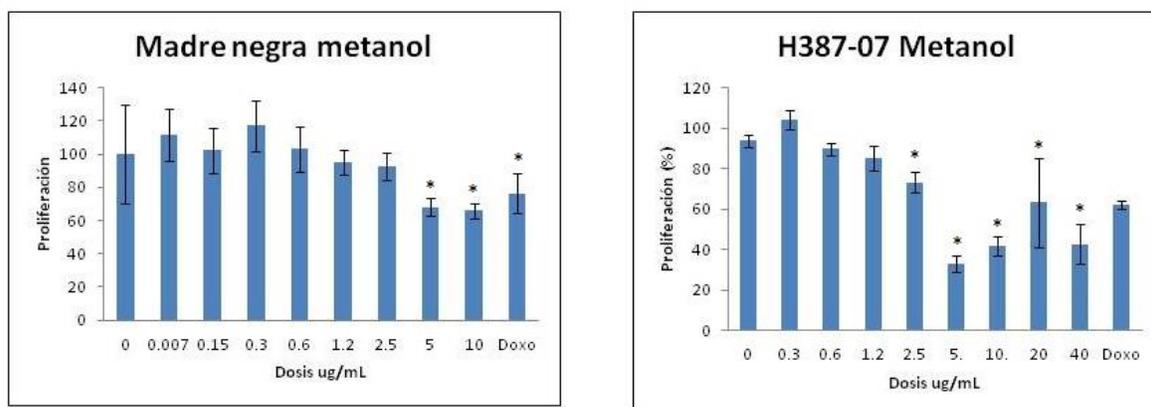
La actividad antiproliferativa de MCF7 con los extractos en diclorometano fue todo lo contrario que los extractos en hexano, ya que en este caso Madre negra presento un efecto significativo desde la concentración 0.07 ug/mL, la cual es una dosis baja, mientras que H387-07 presencio efecto significativo en la dosis 0.15 ug/mL, resaltando la similitud de actividad entre Madre negra y el antineoplásico Doxorrobicina, desde la concentración antes mencionada (Figura 7).

Figura 7. Efecto antiproliferativo de extractos en diclorometano de Madre negra y H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey  $p < 0.05$ ).



H387-07 en metanol presento significancia en la dosis 2.5 ug/mL, mientras que Madre negra en 5 ug/mL, en donde H387-07 presento actividad similar con Doxorrobicina en algunas dosis medias por el contrario en Madre negra esta similitud se mostró en dosis altas (Figura 8).

Figura 8. Efecto antiproliferativo de extractos en metanol de Madre negra y H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluados con la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo. Diferencia significativa \* (Tukey  $p < 0.05$ )



Dentro de los resultados obtenidos con los extractos por polaridad, se observó que el genotipo de H387-07 en extracto en hexano obtuvo una menor  $IC_{50}$  en comparación con el genotipo de madre negra.

El extracto en diclorometano madre negra fue el que presento una menor  $IC_{50}$  7.38 ug/mL, por debajo del hibrido H387-07 con 9.1 ug/mL.

La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de los extractos en metanol respalda los resultados obtenidos que indican que el extracto en metanol de H387-07 reduce la viabilidad de las células con una  $IC_{50}$  de 8.5 ug/mL menor que la de madre negra de 14.6 ug/mL (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de extractos en hexano, diclorometano y metanol de los genotipos madre negra y H387-07, sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7.

<b>Genotipo (Tratamiento)</b>	<b>Hexano <math>IC_{50}</math> ug/mL</b>	<b>Diclorometano <math>IC_{50}</math> ug/mL</b>	<b>Metanol <math>IC_{50}</math> ug/mL</b>
H387-07	6.09	9.1	8.5
Madre negra	8.7	7.38	14.6

## **5.5 Fraccionamiento de extractos de genotipos sobresalientes por actividad antiproliferativa- polaridad-solvente**

### **5.5.1 Identificación de compuestos de las fracciones de H387-07**

En el caso del híbrido H387-07 se determinó realizar un fraccionamiento por cromatografía en capa fina (CCF), debido a que el rendimiento del extracto fue de 0.55 %, para esto se realizó un análisis preliminar del extracto mismo que fue el indicativo de la selección de posibles bandas de interés determinadas por su coloración al ser reveladas con el agente cromogénico, tomando como referencia su índice de retención (rf) para su aislamiento.

Una vez finalizado el fraccionamiento por CCF, el resultado fue de seis fracciones totales, adicionando la fracción cero para descartar la posibilidad de que algún compuesto activo quedara en el punto de aplicación, de las cuales la fracción dos (rf 0.93) obtuvo el mayor rendimiento (0.14 %), se monitorearon por CCF utilizando la fase móvil de hexano-acetato de etilo (16:4) revelado con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, observando la presencia de más bandas con las coloraciones entre azul a morado (Figura 9).

Al comparar cualitativamente con los estándares de cucurbitacinas se observó que la fracciones 0.93 y 0.87 presentaron similitud cromogénica con la cucurbitacina B, por lo cual se espera que al evaluar su actividad antiproliferativa presenten un

efecto significativo ya que se ha visto que este tipo de cucurbitacina presenta una actividad inhibitoria (Jayaprakasam et al., 2003; Wakimoto et al., 2008; Thoennissen et al., 2009; Chen et al., 2010;).

Tabla 9. Fracciones y rendimientos obtenidos del fraccionamiento en cromatografía en capa fina CC del extracto en hexano H387-07.

N. de Fracción/ rf inicial	Rendimiento (%)	Rfs	Color
F1= 0.44	0.09	0.16	morado
		0.75	morado
F2= 0.93	0.14	4	azul
		4.8	morado
		5.6	morado intenso
F3= 0.04	0.06	0.75	morado
		0.8	azul
F4= 0.65	0.03	0.16	morado intenso
		0.25	morado
		0.3125	morado
		0.75	morado
		0.8	azul
F5= 0.77	0.09	0.75	morado
		0.8	azul
F6= 0.87	0.1	0.36	violeta
		0.525	violeta tenue
		5.1	violeta
		0.75	morado
		0.81	azul

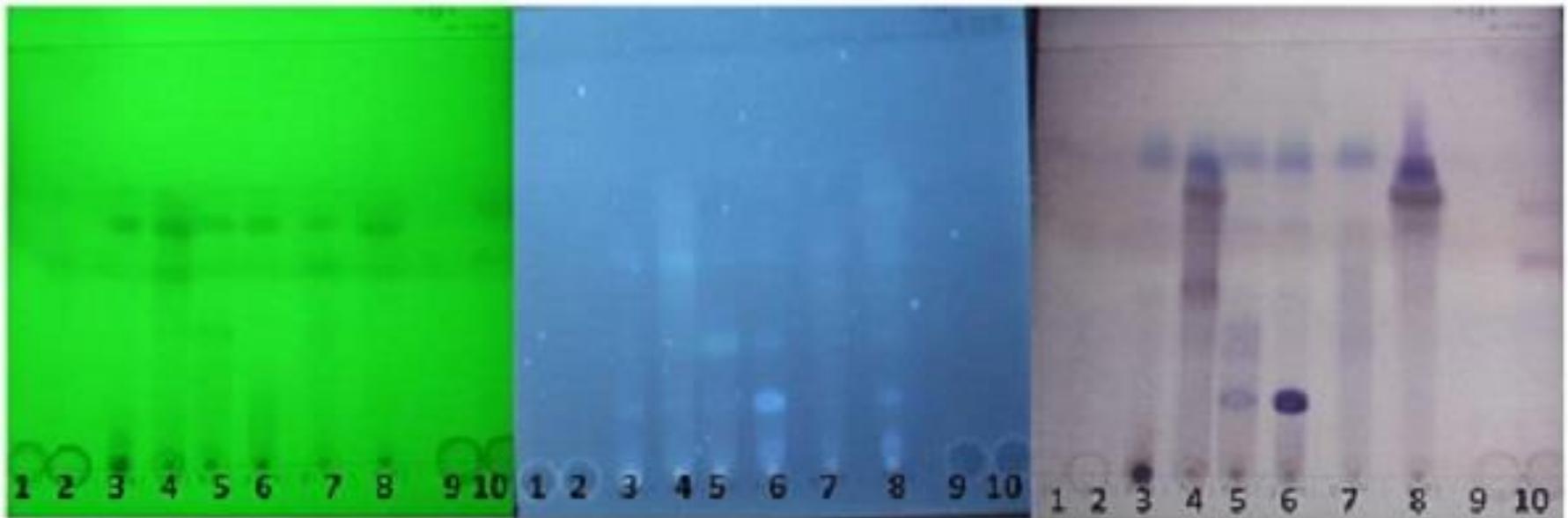


Figura 9. Cromatoplaqueta de las fracciones obtenidas en cromatografía en capa fina del extracto en hexano de H387-07.

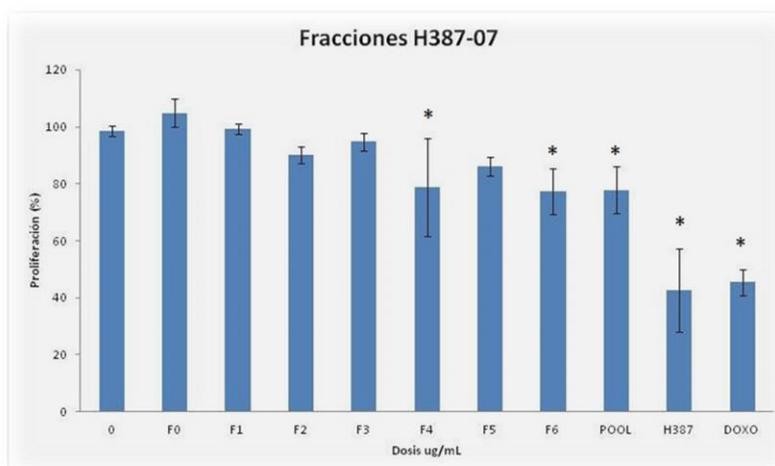
Fase móvil de Hexano/Acetato de etilo (16:4) revelándose con vainillina +  $H_2SO_4$  calentándola a  $110\text{ }^\circ\text{C}$ .

1: cucurbitacina E, 2: cucurbitacina I, 3: Rf. 0.04, 4: Rf. 0.87, 5: Rf. 0.65, 6: 0.44, 7: Rf.0.77, 8: Rf 0.93, 9: cucurbitacina D y B, 10: cucurbitacina B.

Una vez que se determinó que el extracto en hexano de H387-07 presenta una actividad antiproliferativa se evaluó dicho efecto con las seis fracciones totales obtenidas del mismo adicionando la fracción cero, junto con un control, un pool de las fracciones, el extracto inicial en hexano y Doxorrobicina.

Los resultados obtenidos indicaron que las fracciones cuatro, seis y el pool de fracciones presentaron una significancia ( $p < 0.05$ ) comparado con el control, sin embargo comparado con el extracto en hexano no presenta significancia, lo cual confirmo que en este caso las fracciones pierden su actividad antiproliferativa al ser purificadas (Aguñiga., 2013) (Figura 10).

Figura 10. Efecto antiproliferativo de fracciones de H387-07, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo, extracto inicial en hexano de H387-07 y un pool de fracciones. Diferencia significativa respecto al control\*, respecto al extracto inicial † (Tukey  $p < 0.05$ )



### **5.5.2 Identificación de compuestos de las fracciones de Madre Negra**

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos farmacológicos sobre la línea celular MCF7, se observó que el extracto en diclorometano de madre negra presenta un efecto significativo, lo cual indicó realizar el fraccionamiento, que al contrario con el genotipo de H387-07 el extracto en diclorometano de Madre negra fue fraccionado por cromatografía en columna (CC).

Se obtuvo noventa y dos fracciones totales mismas que al ser monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF), se redujeron por identidad cromogénica a ocho fracciones totales, finalmente fueron monitorearon por CCF utilizando la fase móvil hexano-acetato de etilo (50:50), la detección con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 110.

1: Cucurbitacina E, 2: Cucurbitacina I, 3: F1, 4: F2, 5:F3, 6: F4, 7: F5, 8: F6, 9: F7, 10: F8, 11: cucurbitacina B, 12: cucurbitacina B y D (Figura 11).

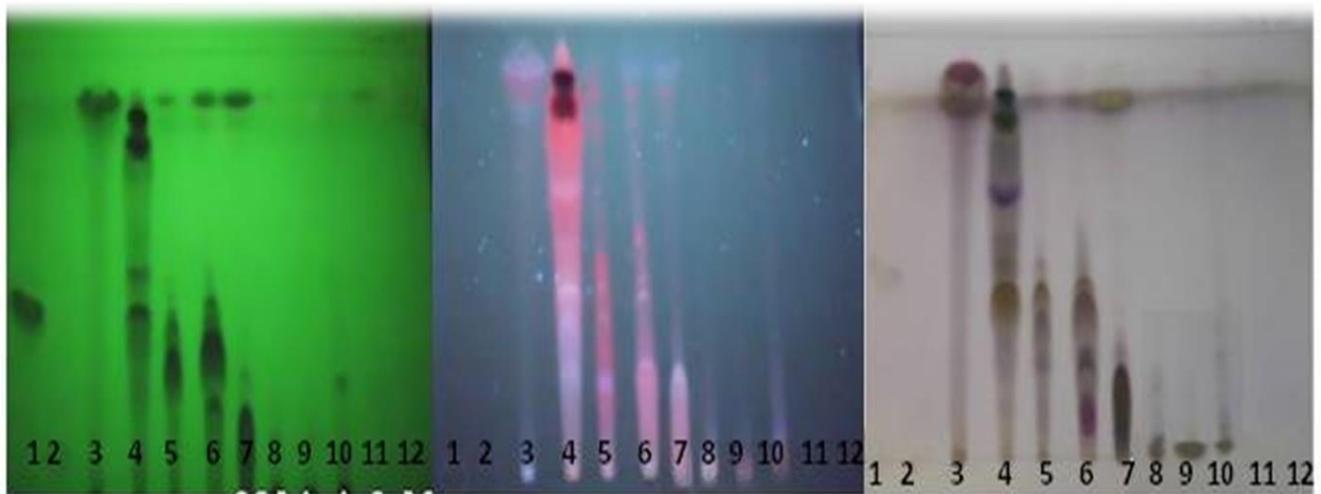


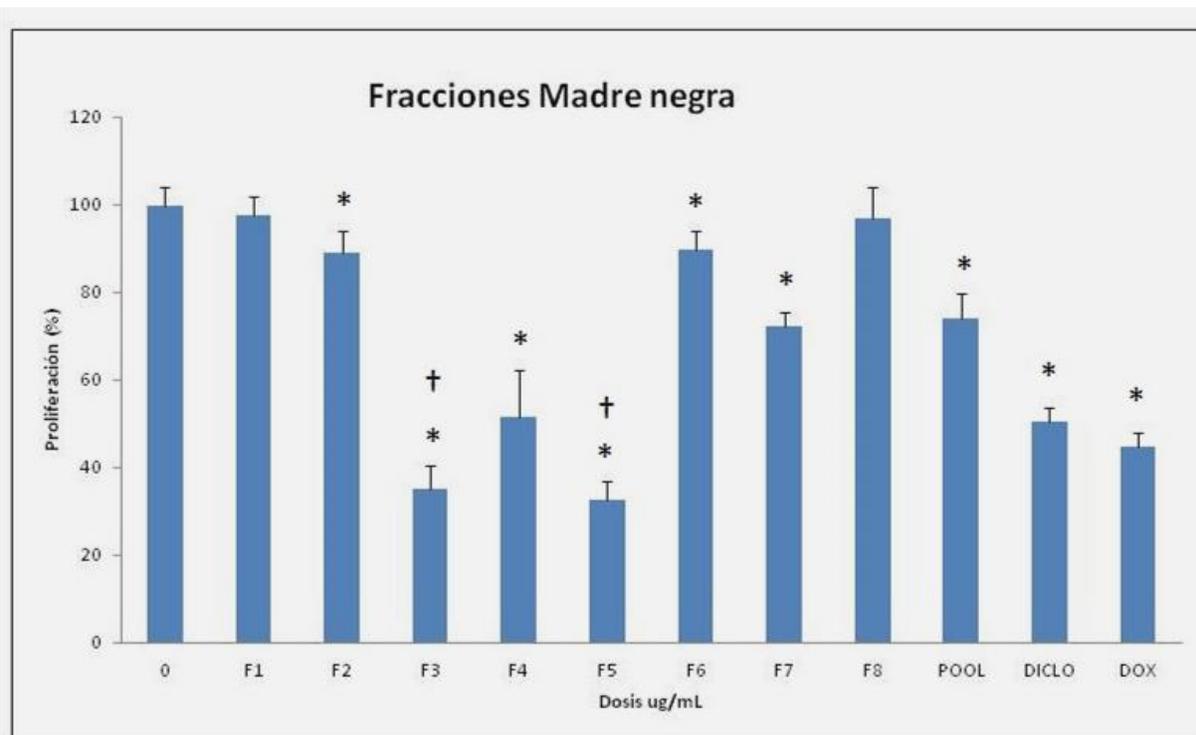
Figura 11. Fracciones finales de Madre negra. Fase móvil hexano/acetato de etilo (50:50), revelado con vainillina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 110 °C. 1: Cucurbitacina E, 2: Cucurbitacina I, 3: f1, 4: f2, 5: f3, 6: f4, 7: f5, 8: f6, 9: f7, 10: f8, 11: cucurbitacina B, 12: cucurbitacina B y D.

En cuanto a los resultados de rendimiento, se partió de 12.7675 gramos de extracto y se recuperaron 10.7985 gramos purificados en las fracciones, los rendimientos mayoritarios obtenidos de las ocho fracciones se encuentra la fracción uno 36.9914%, tres 37.9283% y ocho 37.035% (Tabla 10).

El efecto antiproliferativo de las fracciones de Madre negra presento una actividad diferente a las del híbrido H387-07 debido a que de las ocho fracciones obtenidas de Madre negra comparadas con el control las fracciones dos, tres, cuatro, cinco, seis y siete presentan una significancia de  $p < 0.05$ , junto con el pool de fracciones

y el extracto en diclorometano, registrándose que las fracciones tres y cinco presentan una significancia comparada con el extracto inicial, lo cual nos indica que en este caso dos de las fracciones presentan una actividad antiproliferativa significativa en comparación con el extracto inicial en diclorometano (Figura 12).

Figura 12. Efecto antiproliferativo de las fracciones de Madre negra, sobre, cáncer de mama MCF7. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta, después de 72 horas de cultivo. Los valores son el resultado de ensayos biológicos con sus respectivas repeticiones a los cuales se les adiciono un control con vehículo, extracto inicial en diclorometano de madre negra y un pool de fracciones. Calculando su diferencia significativa respecto al control\* - respecto al extracto inicial † (Tukey  $p < 0.05$ ).



### **5.3 Identificación de principales compuestos activos: fracción-genotipo sobresaliente-actividad biológica**

Los resultados farmacológicos de las ocho fracciones presentaron una significancia notoria con respecto al extracto inicial estas fueron las fracciones tres y cinco las cuales se volvieron a fraccionar con la técnica por CCF obteniendo siete fracciones finales donde a la fracción tres le corresponden tres más y de la cinco cuatro, fueron monitoreadas por CCF utilizando la fase móvil hexano-acetato de etilo (90:10), revelando con el agente cromogénico: vainillina- ácido sulfúrico al 50%, y estándares de cucurbitacinas B, I, D y E, donde se presentó similitud cromogénica entre las fracciones F3 (1),(2) y (3) con la cucurbitacina E y B, mientras que la fracción 5 (2), (3), y (4) presentan similitud con la cucurbitacina D el (Figura13)(Tabla 10).

Figura 13. Identificación de fracciones de Madre negra-GISeM, fase móvil hexano-acetato de etilo (90:10), revelado con vainillina/ ácido sulfúrico al 50% 110 °C.1: Cucurbitacinas E, 2: Cucurbitacina I, 3: F3 (1) ,4: F3 (2), 5: F3 (3), 6: F5 (1), 7: F5 (2), 8:F5 (3), 9:F5 (4), 10: Cucurbitacina B, 11: Cucurbitacina D.

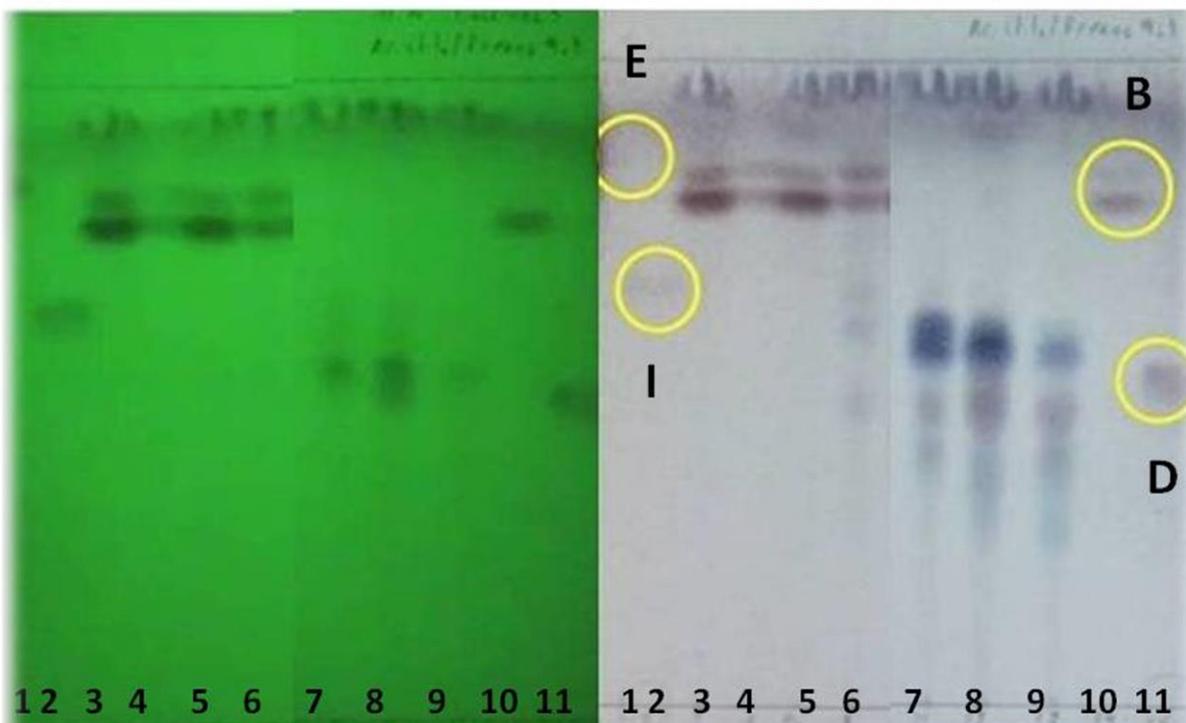


Tabla 10. Fracciones y rendimientos obtenidos del fraccionamiento en cromatografía en capa fina CCF del extracto en diclorometano de Madre negra.

<b>MUESTRA</b>	<b>N. de fracción</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>RFS</b>	<b>COLOR</b>
Cucurbitacina E			0.65	Lila
Cucurbitacina D			0.37	lila
F3 (A)	46-50	1.12	0.73	Morado tenue
F3 (B)			0.63	Marrón tenue
F3 (C)			0.56	lila
F5 (A)	58-79	1.0561	0.7	morado tenue
F5 (B)			0.45	Morado tenue
F5 (C)			0.39	morado
F5 (D)			0.33	marrón
Cucurbitacina B			0.75	morado
			0.6	marrón
			0.56	lila
Cucurbitacina I			0.5	lila

El resultado de la cromatoplaaca anterior mostro los compuestos presentes de acuerdo a su identificación cualitativa al revelarse con el agente cromogénico, lo cual llevo a reafirmar la presencia de estos por medio de la técnica de HPLC misma que permitió la identificación de las fracciones activas.

En la fracción tres se identificó a las cucurbitacinas D, I, B y E (Figura 14), mientras que en la fracción cinco se identificó a las cucurbitacinas I, D y B sin presentarse la cucurbitacina E, además de la presencia un compuesto mayoritario no identificado, que posiblemente se deba a una cucurbitacina, debido a que la metodología realizada es una técnica sensible para la identificación de compuestos como cucurbitacinas (Figura 15).

Figura 14. Análisis por HPLC de la fracción tres Madre negra polaridad diclorometano.

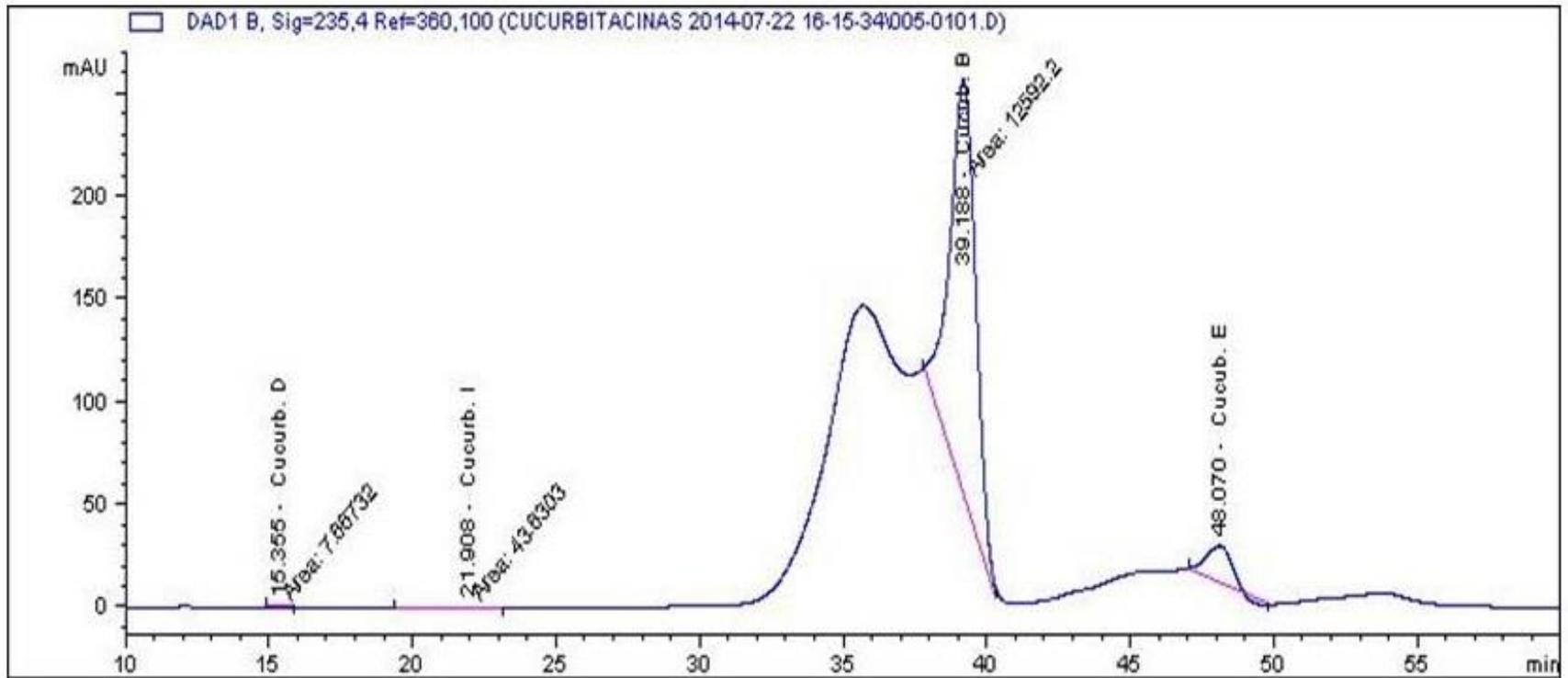
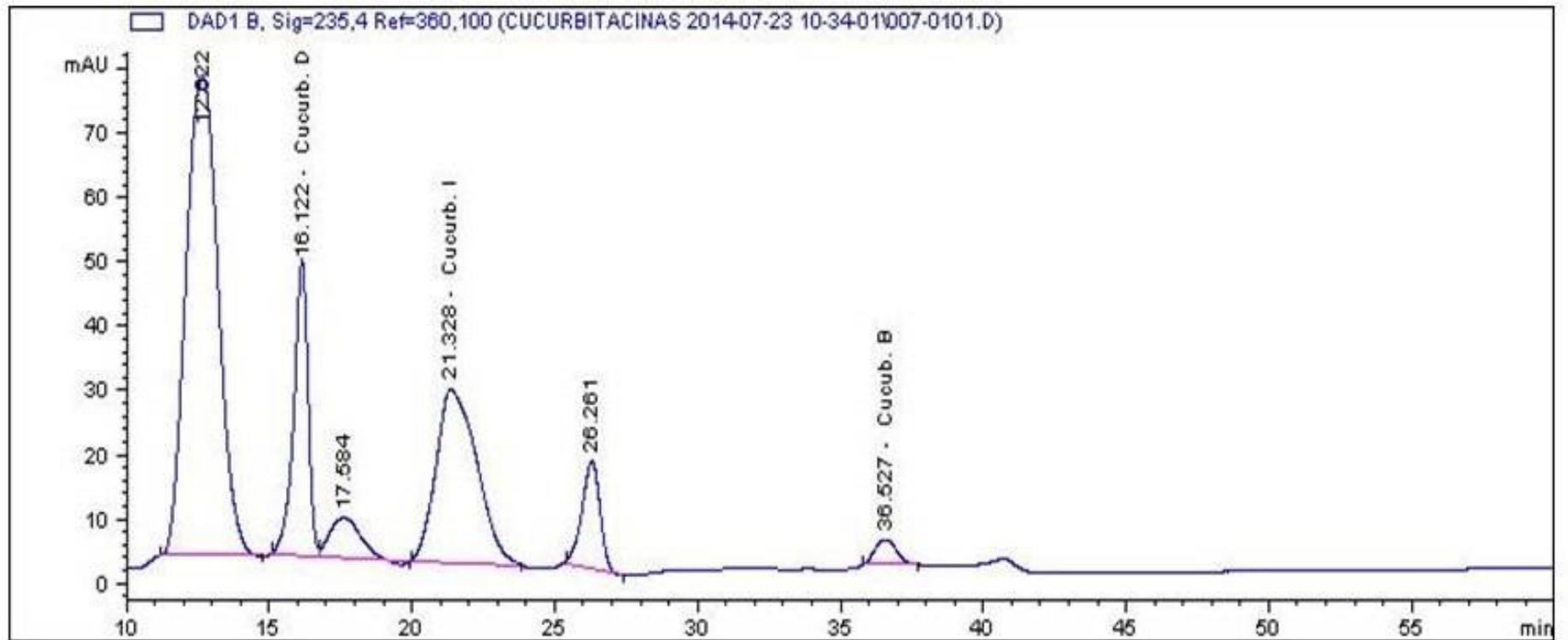


Figura 15. Análisis por HPLC de fracción cinco Madre negra polaridad diclorometano.



La actividad antiproliferativa de la variedad Madre negra se podría sumar al grupo de genotipos de la especie *S. edule* que presentan actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales, y en especial con la línea de cáncer de mama MCF7. Con base en estudios realizados por (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013), se destaca que los genotipos de *S. edule*, presentan diferencias tanto en su actividad inhibitoria de la proliferación celular, como de la dosis y línea celular evaluada, ya que por ejemplo, de ocho grupos varietales de *S. edule* evaluados, se demostró un efecto en las líneas L929, P388 y HeLa, actuando como extractos totales, sin embargo, cuando se fraccionaron el efecto no fue relevante. De igual forma, el extracto crudo del híbrido H387-07-GISeM fue evaluado, sin embargo, al ser fraccionado no mostró algún compuesto activo específico responsable de la actividad biológica, lo cual sugiere que los genotipos, aun cuando tengan un linaje genético cercano, no actúan igual (Aguñiga, 2013). Resulta relevante anotar la actividad antiproliferativa de las fracciones tres y cinco del extracto-diclorometano con la presencia de cucurbitacinas; ya que se ha observado que estos metabolitos presentan citotoxicidad contra una gran variedad de tumores malignos de diversas líneas celulares (Wu *et al.*, 2004; Attard *et al.*, 2005; Bartalis y Haalaweish, 2005). Las cucurbitacinas B, D y E presentes en *Cucurbita andreana* inhibieron la proliferación celular de un carcinoma colorrectal humano (HCT-116), cáncer de mama (MCF7), efecto antiproliferativo en cáncer de pulmón de células humanas (NCL-H460) además de reducción del número de glioblastoma humano (SF268) (Jayaprakasam *et al.*, 2003), o el caso de la cucurbitacina F de *Elaeocarpus dolichostylus* y cucurbitacina Q de *Bradegea bigelovii* que registraron inhibición en la proliferación celular (Fang *et al.*, 1984; Sun *et al.*, 2005). Los datos obtenidos en

este trabajo en cuanto a la presencia de cuatro cucurbitacinas y su toxicidad responden a la pregunta que se planteó originalmente en el sentido de que no había información sobre el efecto inhibitorio de la variedad Madre negra sobre la línea celular MCF7 ni de los compuestos responsables de dicha actividad.

Este estudio lleva a plantear que en *Sechium edule* existe una alternativa de principios activos de origen natural que amplíen las opciones farmacológicas y que puedan formar parte de medicamentos alternativos, a partir de la diversidad local (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005), además que den opciones a las serias limitantes registradas en los agentes quimioterapéuticos y que no desarrollen resistencia por algunas células cancerosas (Setzer y Setzer, 2003).

## 6. CONCLUSIONES

- i. El mayor rendimiento de extractos crudos en metanol fue obtenido por el extracto de Madre negra; y el de menor rendimiento fue el híbrido H-387-07
- ii. En el análisis de los extractos crudos se observó presencia de terpenos, flavonoides, saponinas y taninos, mismos compuestos ya antes reportados en el híbrido H387-07
- iii. La evaluación de los extractos crudos, fue la pauta de seguimiento en la investigación para seleccionar las mejores  $IC_{50}$  y genotipos con una actividad antiproliferativa significativa
- iv. El índice inhibitorio de proliferación media de 6.44  $\mu\text{g/mL}$  del genotipo Madre negra y 9  $\mu\text{g/mL}$  de H387-07 fueron sobresalientes en las evaluaciones de actividad antiproliferativa de extractos crudos
- v. Con respecto a los rendimientos de extractos por polaridad (hexano, diclorometano y metanol), Madre negra y H387-07, presentan mayor rendimiento de extracto en metanol, los extractos de menor rendimiento son en hexano

- vi. H387-07 extracto en hexano obtuvo una  $IC_{50}$  de 6.09ug/mL, Madre Negra extracto en diclorometano presento una  $IC_{50}$  de 7.38 ug/mL
  
- vii. Los extractos crudos y por polaridad presentan actividad antiproliferativa de manera muy diferencial, debido a que en algunos casos se tuvieron que ampliar las curvas de concentraciones para encontrar una  $IC_{50}$  o actividad inhibitoria menor al 50 %
  
- viii. Las actividad antiproliferativa de las fracciones de los diferentes genotipos fue diferencial ya que en el caso del hibrido H387-07 al fraccionarse el extracto en diclorometano y probar sus fracciones puras estas pierden efecto, mientras que el genotipo de madre negra al ser fraccionado, presento actividad significativa en dos de las fracciones totales comparado con el extracto inicial en diclorometano
  
- ix. Se identificaron en el extracto en diclorometano cucurbitacinas E, I, B y D en las fracciones que presentaron actividad antiproliferativa.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Aguñiga I. 2013. Potencial antileucémico in vitro de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México

Anagnostopoulou M., P. Kefalas, V. P. Pagageorgiou, A.N. Assimopoulou, D. Boskou. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 94: 19-25

American Cancer Society. 2013. Cancer Facts and Figures. Atlanta, Ga: American Cancer Society.

American Cancer Society. 2013. Cancer Society. ¿Qué es el cáncer de seno?. Recuperado el 10 de julio del 2013, de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/resumen/resumen-sobre-el-cancer-de-seno-what-is-what-is-breast-cancer>

American Cancer Society. 2013. Cancer Society. Tratamientos y efectos secundarios. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/#>

Attard, E., A. Cuschieri, M.P. Brincat. 2005. Morphological effects induced by cucurbitacin E on ovarian cancer cells *in vitro*. *Journal of natural remedies*. 5 (1): 70-74.

Avendaño-Arrazate, C.H., J. Cadena-Iñiguez, M. de L.C. Arévalo-Galaraza, E. Campos-Rojas, V.M. Cisneros-Solano, J.F. Aguirre-Medina. 2010. Las variedades del chayote mexicano, recurso ancestral con potencial de comercialización. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. México.

Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, W.H Bollinger (1985). Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 228:1154-1160.

Bartalis, J., F.T. Halaweish. 2005. Relationship between cucurbitacins reversed-phase highperformance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Journal of chromatography B, biomedical applications* 818 (2): 159-166.

Barz, W., Koster, J., 1980. Turnover and degradation of secondary (natural) products. In: Conn, E.E. (Ed.), *The Biochemistry of Plants*, vol. 7. Academic Press, New York, London, pp. 35–84.

Becerra, Z. J. 1996. Estudio agroecológico del chayote (*Sechium edule* en el Estado de Veracruz. U. Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. pp. 12-18.

Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated Cucurbits. *Ciencia Rural*, Santa Maria 32:715-723.

Cadena J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. México.

Cadena, I. J.; Ruiz-Posadas, L. M.; Aguirre-Medina, J. F.; Sánchez-García, P. 2005. Estudio de los síntomas asociados a la pérdida de color del chayote (*Sechium edule*) en Veracruz, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 309-316.

Cadena-Iñiguez J.; Arévalo-Galarza L.; Ruiz-Posadas L.; Aguirre-Medina J.; Soto-Hernández, M.; Luna-Cavazos, M.; Zavaleta-Mancera H. 2006. Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* fruit during postharvest. *Postharvest Biology and Technology* 40(2): 170- 176.

Cadena-Iñiguez, J., M.L.C. Arévalo-Galarza, C.H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L. M. Ruíz-Posadas, E. Santiago-Osorio, M. Acosta-Ramos, V.M. Cisneros-Solano, J.F. Aguirre-Medina, D. Ochoa-Martínez. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh Produce* 1: 41-53.

Cadena-Iniguez, J., C.H. Avendaño-Arzate, M. Soto-Hernández, L.M. Ruíz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:835-847.

Cadena- Iñiguez J., M. Soto-Hernández, A. Torres- Salas, I. Aguiñiga- Sanchez, L. M. Ruíz-Posadas, A. R. Rivera-Martinez, E. Santiago- Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.)Sw.) on tomour cell lines. *Journal of Medical Plant Research* 7: 455-46.

CONABIO (1998). *Diversidad Biológica de México: estudio de país*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Citado por

García-Jiménez, A. L. (2009) "Introducción a las plantas medicinales en México" Conferencia dictada en ocasión de la Jornada sobre Plantas medicinales, 8 de octubre 2009, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Casa Libertad, Iztapalapa, México D.F.

Coleman MP et al. (2008). La supervivencia del cáncer en cinco continentes: Un estudio basado en la población en todo el mundo (CONCORD) *Lancet Oncol*, 9, 730-56.

Cook, O. F. 1901. The chayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA. pp. 7-31

Couffignal A. L., Lapeyre-Mestre M., Bonhomme C., Bugat R., Montastruc J. L. 2000. Adverse effects of anticancer drugs: a propos of a pharmacovigilance study at a specialized oncology institution. *Therapie*, 55(5):635-41.

Croteau R, Kutchan, TM, Lewis NG, (2000). Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 1250-1318.

Cheeke, P.R. 1995. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J. Anim. Sci.*, 73: 909-918.

Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep Jun 2005;22(3):386–99*.

Diré G.; Lima, E.; Gomez, M.; Bernardo-Filho, M. 2003. The effects of a chayote *Sechium edule* extracts (decoct and macerated) on the labelling of blood elements with technetium-99m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an in vitro and in vivo analysis. *Pakistan Journal of Nutrition* 2, 221-227

Edwards, R., and Gatehouse, J.A. 1999. Secondary metabolism. pp. 193-218. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.

Fang X, Phoebe Jr. CH, Pezzuto JM, Fong HHS, Farnsworth NR, Yellin B, *et al.* plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. *J Nat Prod* 1984; 47 (6): 988-93

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *WHO-Bulletin of the World Health Organization*, 63:965-981.

Flores M., E. 1989. El Chayote, *Sechium edule* Swartz (Cucurbitaceae). *Revista Biología Tropical* 37:1-54

Gamboa, W. 2005. Producción agroecológica, una opción para el desarrollo del chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.]. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 166-168 pp.

Geissman, T.A. (1964) New substances of plant origin. *Annu. Rev. Pharmacol.* 4, 305–316.

Ginebra, 2008. [Consultado 2011 julio]. Disponible en: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf)

Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México [GISeM]. (2008). Colecta, caracterización y conservación de *Sechium spp.* Informe en extenso Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos- SAGARPA, México, DF. pp. 102

Haaz M. C., Rivory L., Riche C., Vernillet L., Robert J. 1998. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Research*, 58:468-472.

Harborne, J.B. 1993. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London.

Hernández, X. E. 1985. *Biología Agrícola*. CECSA. México. 62 p. INNSZ. 1996. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran: *Tablas de Composición de Alimentos*. Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos. 248 p.

Huges, A.R., B.D. Inouye, M.T.J. Johnson, N Underwood y M. Vellend. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11: 609-623.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. 2010. Estadísticas a propósito del día de Mundial contra el Cáncer. Disponible en: [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../cancer0.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../cancer0.doc)

Jayaprakasam, B.; N. P. Seeram and M. G. Nair. 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer letters* 189: 11-16.

Jennings DH, Trewavas AJ (1986). Plasticity in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 40:1-4.

Jensen, L.P.; Lai, A.R. 1986. Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *American Journal Obstetrics Gynecology*. 5: 1048-1049.

Johnson I. S. 1968. Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemotherapy Reports*, 52:455-461.

Lasfargues EY, Ozzello L 1958 Cultivation of Human Breast Carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 21:1131-1147

Lira, R.; Chiang, F. 1992. Two new combinations in *Sechium* (Cucurbitaceae) from Central America and a new species from Oaxaca, México. *Novon* 2:227-231

Lira-Saade, R. 1996. Chayote *Sechium edule* (Jacq.)Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Report No. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 57-58 p.

Lira Saade, R. 2001. Cucurbitaceae. Flora del bajío y Regiones adyacentes. Fascículo 92. Universidad Nacional Autónoma de México.

Lira-Saade, R., and J. Caballero. 2002. Ethnobotany of the wild Mexican Cucurbitaceae. *Econ. Bot.* 56: 380-398.

Malikov V. M., Yunusov S. Y. 1977. Vinca alkaloids. *Chemical of Natural Compounds*, 13(5):497-512.

Monroy-Vázquez, M.E., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, E. Santiago-Osorio, L.M. Ruíz-Posadas y H. Rosas-Acevedo. 2009. Estudio bidirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia* 43:777-790.

N.H. Thoennissen, G.B. Iwanski, N.B. Doan, R. Okamoto, P. Lin, S. Abbassi, J.H. Song, D. Yin, M. Toh, W.D. Xie, J.W. Said, H.P. Koeffler, Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 5876–5884.

N. Wakimoto, D. Yin, J. O’Kelly, T. Haritunians, B. Karlan, J. Said, H. Xing, H.P. Koeffler, Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Sci.* 99 (2008) 1793–1797.

Ordoñez A, J. Gomez, M. Vattuone, M. Islas. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry* 97: 452- 258

Organización Mundial de la Salud. Carga Mundial de Morbilidad, 2004. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>

Organización Mundial de la Salud. 2011. Cáncer. Fact sheets num. 297. Octubre, 2011. Recuperado el 9 de enero de 2012, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 5 de diciembre de 2013, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Ortega-Paczka, R; Martínez-Alfaro, MA; Rincon-Enriquez, G.1998. Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de Fitogenética. SOMEFI. Acapulco, México. p. 321.

Oliveira M. A., Velázquez D., Bermúdez, A. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos actuales. *Interciencia*, 30:453-459.

Peach, K., 1950. *Biochemie und Physiologie der Sekundären Pflanzenstoffe*. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg.

Preeti V., and Arnold L. 2010. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 29: 223–229.

Reznik, H., 1960. Vergleichende biochemie der phenylpropane. *Ergebnisse der Biologie* 23, 14–46.

Rosing H., Zomeren D. M. V., Doyle E., Bult A., Beijnen J. H. 1998. O glucuronidation, a newly identified metabolic pathway for topotecan and N-desmethyl topotecan. *Anticancer Drugs*, 9:587-592.

Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. Oxford University Press. pp.129-144

Rzedowski, J. 1995. Aspectos de las plantas ornamentales mexicanas. Chapingo, Serie: Horticultura. Vol. 1 No. 3: 5-7

Salama, A.M.; Polo, A.E.; Contreras, C.R.; Maldonado, L. 1986. Analisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 15: 79-82.

Salama, A. M.; Achenbach, H.; Sánchez, M.; Gutierrez, M. 1987. Aislamiento e identificación de glicósidos antiinflamatorias de los frutos de *Sechium edule*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 16: 15-16.

Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. (2013). Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 10 de enero de 2014, de: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>

Setzer, W.N.; Setzer, M.C. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini reviews in Medicinal Chemistry 3(6): 540- 556.

Siciliano, T.; De Tommasi, N.; Morelli, I.; Braca, A. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (cucurbitacea) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Journal Agriculture Food Chemistry 5: 6510-6515.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M 1973 A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1416

Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebt SM. Cucurbitacin Q: a T3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 2005; 24 (20): 3236-45

Spalding EP (2003). Light signaling. *Plant Physiol.* 133:1417-1419.

Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhall A. T. 1971. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus breoifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9):2325-2327.

W. Chen, A. Leiter, D. Yin, M. Meiring, V.J. Louw, H.P. Koeffler, Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines, *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 737–743.

Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M.Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p

Wu, T. H.; Chow, L. P.; Lin, J. Y. 1998. Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* Swartz-purification, characterization, molecular cloning and expression. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 255: 400-408.

Xia X, Hou F, Li J, Ke Y, Nie H. Two novel proteins bind specifically to trichosanthin on choriocarcinoma cell membrane. J Biochem Apr 2006;139(4):725–31.