

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANOLICO DE
HOJAS DE *Agave lechuguilla* Torrey, SOBRE CELULAS
CHANG CULTIVADAS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO:
MEM Y MCR.

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTADA POR
MARIA GUADALUPE SANTIAGO MAURICIO

CD. UNIVERSITARIA

NOVIEMBRE DE 2006

MCSM

TL
QH585
.2
.S26
2006
c.1

2006



1080092007

Para la Dra. Catalina Rivas:

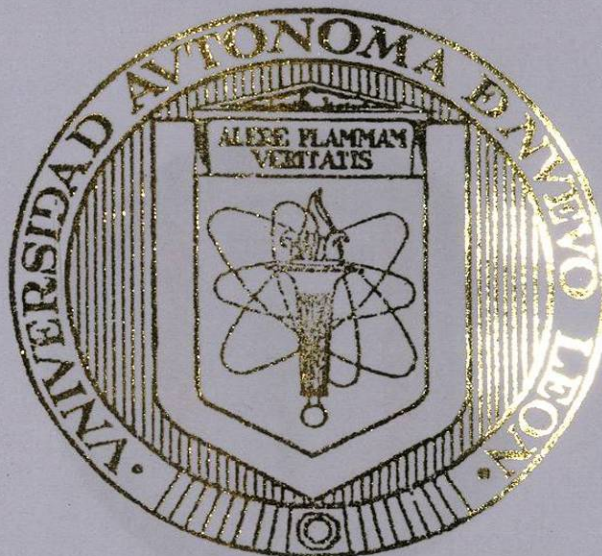
18

Con mucho cariño y agradecimiento

Ma. Guadalupe Santiago Mauricio

~~MS~~
17/11/06

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE
Agave lechuguilla Torrey, **SOBRE CÉLULAS CHANG CULTIVADAS**
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: MEM Y MCR.

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTADA POR:

MARÍA GUADALUPE SANTIAGO MAURICIO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN.

NOVIEMBRE DEL 2006.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Agave lechuguilla* Torrey, SOBRE CÉLULAS CHANG CULTIVADAS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: MEM Y MCR.

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTADA POR:

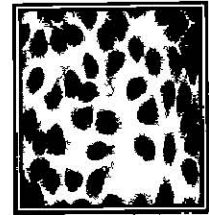
María Guadalupe Santiago Mauricio

San Nicolás de los Garza, N.L.

Noviembre del 2006



**CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE HOJAS DE *Agave lechuguilla* Torrey, SOBRE
CÉLULAS CHANG CULTIVADAS EN DOS MEDIOS
DE CULTIVO: MEM Y MCR**



COMISIÓN DE TESIS

**Dra. Catalina Rivas Morales
Presidente**

**Dra. María del Pilar Carranza Rosales
Directora Externa**

**Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Secretaria**

**Dra. Maria Julia Verde Star
Vocal**

**Dra. Sonia Yesenia Silva Belmares
Suplente**

DEDICATORIA

A mis Padres:

Domingo Santiago del Ángel y Ciria Mauricio Santiago

Gracias por todo lo que me han brindado a lo largo de mi vida; confianza, orientación y apoyo incondicional en todas mis decisiones y sobre todo que hayan sembrado en mí ese espíritu de lucha por lograr mi superación profesional y personal, día con día.

A mi Hermano:

Domingo Santiago Mauricio

Gracias por estar siempre conmigo y hacerme sentir que las cosas son más fáciles de lo que parecen, por ese apoyo incondicional y cariño que me muestras. Junto con mis padres has contribuido a forjar mi carácter.

Deben saber que son las personitas más importantes en mi vida, gracias por dejarme ser.

A mis Enanos:

Néstor, Omar, Ana, Lolita, Karina, Yahaira e Iván

Por ser parte importante de mi vida, que hace que no se me olvide el que todos llevamos un niño interno que no debemos dejar ir.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mayor agradecimiento a:

Dra. Catalina Rivas Morales.

Por creer en mi, por su apoyo y las oportunidades que me ha brindado a lo largo de mi carrera profesional, además de su paciencia y sus enseñanzas constantes.

Dra. Maria del Pilar Carranza Rosales.

Por tu gran apoyo constante, tu paciencia y consejos para la realización de esta tesis y para la vida profesional, pero sobre todo por tu amistad.

Dra. Azucena Oranday Cárdenas.

Por formar parte de mi comité de tesis y por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión de este trabajo.

Dra. Maria Julia Verde Star.

Por su disponibilidad en todo momento y por formar parte de mi comisión de tesis.

Dra. Sonia Yesenia Silva Belmares.

Por acompañarme y ser una persona importante dentro mi carrera profesional, por el apoyo constante, los conocimientos otorgados y la amistad brindada.

A mis compañero y amigos.

Melisa, Clara, Gabriela, Diana, Martha, Porfi, Antonio, Rodolfo, Noe, Carlos Felipe, Carlos Aguirre, Charly, Víctor, Efrén, Ezequiel.

Por estar siempre a mi lado en todo momento, y no dejarme caer. Gracias por brindarme un poquito de cada uno de ustedes y sobre todo por forma parte de una etapa muy importante de mi vida, la cual ayudaron a que fuera más ligera y agradable.

Y a todas las personas que me he encontrado en el camino que me han orientado y ayudado a formar mi carácter personal y profesional.

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizo en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (Instituto Mexicano del Seguro Social) y en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

INDICE

	Página
Dedicatoria	<i>i</i>
Agradecimientos	<i>ii</i>
Área de trabajo	<i>iii</i>
Índice	<i>iv</i>
Lista de figuras	<i>vi</i>
Lista de tablas	<i>vii</i>
Abreviaturas y símbolos	<i>viii</i>
Resumen	<i>x</i>
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Cultivo Celular	4
2.2 Medios de Cultivo	6
2.2.1 Utilización de nuevos medios de cultivo	9
2.3 Ensayos de Citotoxicidad	11
2.4 Técnica WST-1	11
2.5 Células Chang (CCL-13)	12
2.6 Plantas con Actividad Biológica	13
2.6.1 Generalidades	13
2.6.2 Clasificación Botánica	14
2.6.3 Descripción Botánica	15
2.6.4 Distribución Geográfica	16
2.6.5 Hábitat	16
2.6.6 Usos Tradicionales	17
2.6.7 Composición Química	17
3.- Hipótesis	20
4.- Objetivo General	21
5.- Objetivo Especifico	21

INDICE

	Página
6.- Importancia	22
7.-Originalidad	23
8.-Material y Métodos	24
8.1 Material Vegetal	25
8.1.1 Preparación del Material Vegetal	25
8.1.2 Extracción del Material Vegetal	26
8.2 Mantenimiento de las Células	26
8.2.1 Cultivo de la Línea Celular CHANG	26
8.2.2 Resiembra y mantenimiento de las células	27
8.3 Cinética de Crecimiento	27
8.4 Determinación de Citotoxicidad	28
8.5 Morfología de las Células Cultivadas en MEM y MCR	29
9.-Resultados	30
9.1 Numero de Herbario	30
9.2 Rendimiento de la Planta	31
9.3 Cinética de Crecimiento	31
9.4 Efecto citotóxico de <i>A. lechuguilla</i> sobre la línea celular CHANG cultivada en medio MEM y MCR	33
9.4.1 Efecto del extracto etanólico de <i>A. lechuguilla</i> sobre la viabilidad de las células cultivadas en MEM y MCR	35
9.5 Morfología de la línea CHANG crecida en los medios MEM y MCR	37
10.- Discusión	40
11.-Conclusión	44
12.-Bibliografía	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.- Línea celular CHANG creciendo en monocapa en medio MEM, teñido con Giemsa	12
2.- <i>Agave lechuguilla</i> Torrey	13
3.- Lugar de colecta de <i>A. lechuguilla</i>	25
4.- Montaje de las hojas de <i>Agave lechuguilla</i>	30
5.- Curva de crecimiento de la línea celular CHANG en dos medios de cultivo MEM y MCR	32
6.- Efecto citotóxico de <i>A. lechuguilla</i> sobre la línea CHANG crecida en el medio MEM	33
7.- Efecto citotóxico de <i>A. lechuguilla</i> sobre la línea CHANG crecida en el medio MCR	34
8.- Citótoxicidad del extracto etanólico de <i>A. lechuguilla</i> sobre la línea CHANG crecida en dos medios MEM y MCR en función de la absorbancia (A) y viabilidad (B).....	36
9.- Morfología presentada por la línea CHANG crecida en el medio MEM ante el efecto citotóxico de <i>A. lechuguilla</i> a distintas dosis.....	38
10.- Morfología presentada por la línea CHANG crecida en el medio MCR ante el efecto citotóxico de <i>A. lechuguilla</i> a distintas dosis	39

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Composición básica de un medio para el cultivo de células de mamífero.....	8
2.- Rendimiento de las hojas de <i>A. lechuguilla</i>	31
3.- Porcentajes de viabilidad mostradas por las células CHANG luego de ser incubadas con las diferentes concentraciones del extracto de <i>A. lechuguilla</i>	35

ABREVIATURA Y SIMBOLOS

Amortiguador Salino de Fosfatos	PBS
Bicarbonato de sodio	NaHCO₃
Células de hígado humano	CHANG
Células de riñón de cerdo	LLC-PK
Células de riñón de zarigüeya	OK
Centímetros	cm
Centímetro cuadrado	cm²
Cloruro de calcio	CaCl₂
Cloruro de magnesio	MgCl₂
Cloruro de potasio	KCl
Cloruro de sodio	NaCl
Dióxido de carbono	CO₂
Fosfato de sodio monobásico	NaH₂PO₄
Grados centígrados	°C
Gramos	g
Horas	h
Medio Mínimo Esencial de Eagle	MEM
Microgramos	µg

ABREVIATURA Y SIMBOLOS

Microlitro	μL
Mililitro	mL
Milímetros	mm
Minutos	min
Nanómetros	nm
Porcentaje	%
Potencial de hidrogeno	pH
Unidades Internacionales	UI
Revoluciones por minuto	rpm

RESUMEN

Los cultivos celulares son considerados valiosos como herramienta en distintos campos de investigación biomédica y en la producción de biológicos como vacunas virales, productos inmunológicos, entre otros. También permiten realizar estudios de toxicidad *in vitro* de nuevas moléculas de origen natural o sintético. Por lo que es importante la validación de nuevos medios de cultivo que tengan un buen rendimiento y que a un menor costo faciliten la experimentación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla* Torrey, sobre células CHANG cultivadas en dos medios de cultivo MEM (medio control) y MCR (medio formulado). Se realizaron ensayos de citotoxicidad en placas de 96 pozos probando diferentes concentraciones del extracto (50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$) y además se tiñeron las células con colorante Giemsa para estudiar su morfología y evidenciar cualquier anomalía celular. También se realizaron cinéticas de crecimiento para observar el comportamiento de la línea celular en ambos medios. Las pruebas de citotoxicidad revelaron que el extracto etanólico de las hojas de *A. lechuguilla* es tóxico a las concentraciones de 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ comparado con el presentado por el control positivo (Triton X-100). La morfología de las células CHANG cultivadas en ambos medios va cambiando conforme se incrementa la concentración del extracto ya que la forma del núcleo se vuelve irregular, la proporción entre núcleo y célula se va perdiendo, además de presentar la formación de un mayor número de vacuolas. Con respecto al crecimiento celular, a pesar de que la línea celular CHANG presentó tiempos de generación que caen dentro del rango normal de 12 a 24 h para células de mamífero, las células crecidas en MEM presentan un tiempo de generación de 22 h, mientras que para las células cultivadas en MCR el tiempo de generación es de 24 h. Como conclusión se puede sugerir la utilización del medio MCR para la realización de estudios generales, tales como la selección primaria de un grupo de plantas que se les quiera determinar su efecto citotóxico, o en la práctica académica puede ser utilizado para iniciarse en el manejo de los cultivos celulares.

1. INTRODUCCION

El cultivo celular surgió a principio del siglo XIX como un método para el estudio sistemático de las células animales, en un ambiente controlado, libre de factores físico-químicos a los cuales se encuentran sometidas normalmente en los organismos multicelulares (Karp, 1996). Con las técnicas de cultivo celular se ha logrado un gran avance en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares que ocurren a nivel molecular, bioquímico y fisiológico (Freshney, 2000).

El uso de cultivos celulares ha favorecido el avance en diversas áreas de la investigación biomédica y en la industria. Por ejemplo la comprensión actual sobre las células cancerosas, aunque limitada en contraparte con la células normales, se debe en gran medida a los estudios en cultivos celulares (Karp, 1996). También permiten realizar estudios de toxicidad *in vitro*, de las nuevas moléculas de origen natural, sintéticas o semisintéticas, durante las primeras etapas de desarrollo de un fármaco. En el área de productos naturales, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* han permitido estudiar la actividad biológica de distintas plantas.

Con respecto a esto último, investigadores y compañías farmacéuticas muestran un interés cada vez mayor en los productos naturales y sus principios activos, debido a que representan una fuente muy importante para la obtención de nuevos medicamentos. En el 2001 y 2002, aproximadamente una cuarta parte de las drogas más vendidas en el mundo eran productos naturales o derivados de ellos (Balunas, 2005).

Una consideración importante que se debe tener en cuenta para lograr cultivar células *in vitro* es el “medio ambiente celular”, el cual debe ser lo más parecido posible al que existe *in vivo*. Respecto a lo anterior, el medio de cultivo es uno de los factores más importantes, por lo que se han desarrollado diversos medios de cultivo que cumplan con este propósito. Entre los más utilizados se encuentran el medio basal de Eagle (BME), que es uno de los primeros medios definidos (Eagle, 1955), el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio mínimo esencial de Eagle (MEM) de uso más generalizado (Sigma 2003-2004). Aunque estos medios se encuentran disponibles comercialmente en el mercado, los costos y tiempo de importación representa una limitante para el avance en investigación que emplea cultivos celulares en países en vías de desarrollo.

El desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos, las técnicas de separación celular (Moscona, 1952), instalaciones asépticas, dispositivos de cultivo, y la suplementación del medio con suero fetal bovino, han sido innovaciones que han permitido el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos celulares *in vitro*, contribuyendo así a que el cultivo celular sea una tecnología con alta reproducibilidad.

En este mismo orden de ideas, la formulación de nuevos medios de cultivo celular que permitan el crecimiento celular de manera similar a como ocurre en los medios disponibles comercialmente y que sean económicamente más accesibles, representa una alternativa interesante en la investigación que emplea cultivos celulares.

2. ANTECEDENTES

2.1 CULTIVO CELULAR

El cultivo de células animales es sumamente complejo, con muchas variables que pueden influir en la respuesta de las células (Durán, 2004). Siendo su mayor ventaja el que las células pueden subcultivarse indefinidamente, además son de gran valor para el estudio en distintas áreas de investigación.

El cultivo de células *in vitro* tuvo su origen en el siglo XIX, con la utilización de bloques de agar con plasma coagulado en la que se analizaba la teoría neuronal, la cual afirmaba que cada fibra nerviosa es una prolongación de una sola célula nerviosa y no el producto de la fusión de varias células (Freshney, 1987); con lo anterior Ross Harrison logró por primera vez cultivar células vivas de vertebrados fuera del cuerpo humano en 1907. Por otra parte, Alexis Carrel cultivó células en diferentes condiciones y encontró que si se proporcionaba el medio ambiente adecuado para las células y si el medio de cultivo se cambiaba regularmente, las células podrían permanecer viables durante un largo periodo, de hecho, aisló un trozo de corazón de pollo y lo conservó vivo en cultivos de 1913 a 1946, cuando finalizó el experimento sin que hubiera muerto el tejido (Karp, 1996).

Las células del hombre, al igual que las de pollo, crecen rápidamente y se multiplican indefinidamente si disponen de alimentos, condiciones adecuadas y si se eliminan los productos de desecho (Karp, 1996). Gey en 1952, estableció una línea continua de células derivadas de carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la línea celular HeLa.

La técnica de cultivo de células, hasta hace pocos años, era utilizada solamente para el estudio de la estructura y función celular; y por los virólogos para el aislamiento, caracterización, estudio del ciclo replicativo y patogenicidad de distintos agentes virales, así como también en el desarrollo de vacunas contra los mismos. Actualmente, ha pasado a ser una herramienta indispensable para los toxicólogos y farmacéuticos para el ensayo de nuevas drogas reemplazando parcialmente a los animales de laboratorio. Se utilizan líneas celulares continuas en pruebas de citotoxicidad como una medición de calidad, de aguas de uso industrial, agua potabilizada para ser distribuida por red, efluentes industriales y desagües hospitalarios, en busca de agentes contaminantes biológicos y químicos. Se utiliza en medicina el cultivo de epitelio humano, injertado en pacientes con quemaduras, y en la producción y utilización de anticuerpos monoclonales, linfoquinas, enzimas, hormonas, entre otros (Bu'Lock, 1987; Junqueira, 1998).

2.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los primeros intentos para hacer crecer diferentes tipos de células, en particular las normales, tuvieron que superar gran número de dificultades. Por lo que la atención se enfocó en la naturaleza de los medios de cultivo y en los ingredientes que podían promover mejor la proliferación de los diversos tipos celulares. En estudios iniciales, a los medios de cultivo se les adicionaban líquidos obtenidos de sistemas vivos, como la linfa, suero sanguíneo u homogenizados embrionarios (Karp, 1996).

Eagle en 1955, realizó la primera investigación sistemática acerca de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo.

De acuerdo a distintas investigaciones se ha encontrado que tanto las células normales como las líneas celulares propagadas necesitan para crecer una considerable variedad de nutrientes como vitaminas, aminoácidos, cofactores, carbohidratos, sales, factores de crecimiento, hormonas, lípidos, entre otros, estos últimos nutrientes las líneas celulares los adquieren al complementar los medios de cultivo con suero (Eagle, 1955; Karp, 1996).

Para la mayoría de los objetivos en experimentos que utilizan cultivos celulares que crecen en monocapas adherentes, resulta adecuado el empleo de un medio de cultivo de uso general. El medio esencial mínimo de Eagle (MEM) se desarrolló para células de mamífero que crecen en monocapa y es el ejemplo de un medio de uso rutinario el cual está constituido por 30 diferentes componentes (ver tabla 1 para observar la composición de un medio básico para el cultivo de células de mamífero), entre los que se encuentran, aminoácidos, vitaminas, azúcares y otros factores metabólicos que son indispensables para la supervivencia de las células que se propagan en ellos.

Tabla 1. Composición de un medio básico para el cultivo de células de mamífero.

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros Componentes	Proteínas (necesarias en medios químicamente definidos, libres de suero)
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Estreptomina	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Rojo fenol	
Isoleucina	Pantotenato	CaCl ₂	Suero total	
Leucina	Piridoxal	MgCl ₂		
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

2.2.1 UTILIZACION DE NUEVOS MEDIOS DE CULTIVO

Actualmente el cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de incubadoras que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y los aíslan del medio exterior.

Para la formulación de nuevos medios de cultivo se puede utilizar como base la composición de uno ya definido químicamente que permite el crecimiento de la línea celular que se quiera adaptar al nuevo medio, posteriormente de acuerdo a resultados de estudios experimentales se logra establecer las concentraciones idóneas de cada uno de sus componentes individuales, para lograr su optimización y principalmente para que puedan brindar las condiciones necesarias para mantener la supervivencia de la línea celular que se propagará en el nuevo medio (Espinosa, 2005).

En el presente trabajo se utilizó el medio de cultivo MCR, el cual fue diseñado en la Facultad de Ciencias Biológicas en colaboración con el Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

Este medio consta de 10 ingredientes, entre los cuales se encuentran sales, glucosa, fuente de nitrógeno a base de peptona de colágena y fuente de vitaminas en forma de extracto de levadura para la propagación *in vitro* de las líneas celulares de mamífero OK (riñón de zarigüeya), CHANG (hígado humano) y LLC-PK₁ (riñón de cerdo).

De acuerdo con los primeros ensayos de adaptación celular, en la cinética de crecimiento de las células propagadas tanto en MEM como en MCR se obtuvo un patrón de crecimiento similar y no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares cultivadas en ambos medios. En cuanto a la morfología observada al microscopio de luz, no se observaron diferencias en los tres tipos celulares empleados que se cultivaron en MCR con respecto a las células cultivadas en MEM. Los ensayos de citotoxicidad con cloruro mercuríco mostraron que las tres líneas celulares cultivadas en MCR no presentan diferencias significativas comparadas con los cultivos crecidos en MEM. Igualmente, la viabilidad después de un proceso de criopreservación no se vió afectada (Espinosa, 2005).

Este medio se utilizó para llevar a cabo estudios de citotoxicidad de extractos metanólico de las plantas *Hedeoma drummondii*, *Eysenhardtia polystachya* y *Acacia rigidula* sobre la línea celular OK y CHANG, en el que se encontró que el extracto metanólico de *Hedeoma drummondii* fue el que presentó mayor citotoxicidad sobre ambas líneas celulares, mencionándose también que se observó un buen desarrollo de las células en el medio de cultivo MCR comparada con su crecimiento en el medio MEM (Leos, 2005).

Por lo anterior, se sugiere que el medio MCR puede representar una alternativa más económica para la realización de trabajos de investigación en los que se utilicen cultivo de células de mamífero (Espinosa, 2005; Leos, 2005).

2.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden no correlacionarse directamente con los obtenidos *in vivo*. Sin embargo, si un material de prueba induce una reacción citotóxica en las pruebas de cultivo celular, es muy probable que también ejerza toxicidad en el tejido vivo (Durán, 2004). No obstante, aunque el cultivo celular no puede reemplazar a los ensayos *in vivo*, es una alternativa válida en muchas situaciones.

2.4 TÉCNICA WST-1

Una prueba de viabilidad/citotoxicidad ampliamente utilizada es la reducción de WST-1, la cual es un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que ayuda a medir la viabilidad celular, por la conversión de una sal de tetrazolio a formazán realizada por las mitocondrias de células vivas. Esta valoración es importante ya que la mitocondria es un organelo clave en el equilibrio celular, lo que le permite ser un indicador adecuado de daño celular. Es una técnica sensible, rápida y sencilla comparada con otras técnicas de citotoxicidad como el MTT, y sus variantes el XTT o el MTS (Leos, 2005).

2.5 LINEA CELULAR CHANG (CCL-13)

La línea celular CHANG, fue establecida a partir de tejido normal de hígado (Chang, 1954) y se emplea para estudiar función hepática, esta línea crece formando monocapas (Figura 1), proporcionada por el laboratorio de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

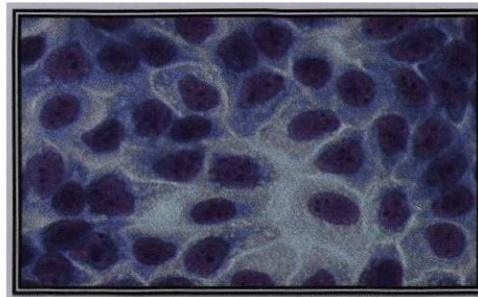


Figura 1. Línea celular CHANG creciendo en monocapa en medio MEM. Tinción de Giemsa.

2.6 PLANTAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.6.1 GENERALIDADES

La familia *Agavaceae* incluye especies características de zonas desérticas, las cuales tienen la particularidad de absorber el agua con rapidez y almacenarla en sus tejidos esponjosos, en donde queda protegida de la evaporación mediante una gruesa cutícula y por una capa de cera. Incluye unas 300 especies con 9 géneros; dentro de esta familia se encuentra *Agave lechuguilla* Torrey (Lechuguilla), la cual es una planta de zonas áridas y semiáridas, que crece en terrenos calizos y rocosos (Figura 2).

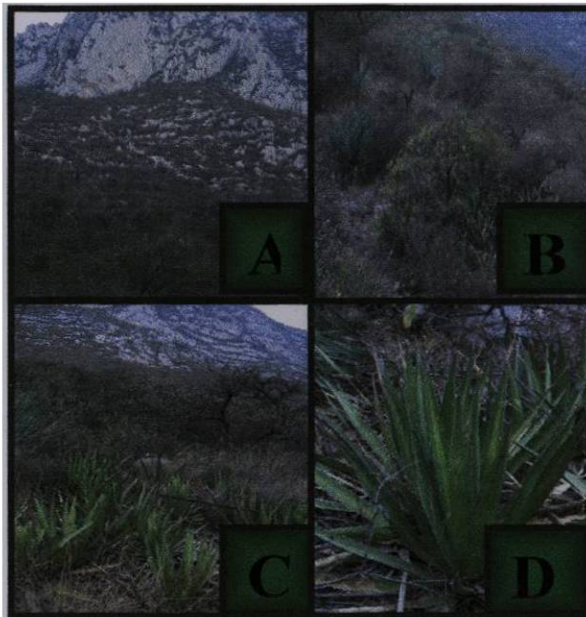


Figura 2. *Agave lechuguilla* Torrey. A) Hábitat, B y C) Comunidad de *A. lechuguilla*,

D) Disposición de las hojas en roseta.

Esta planta se utiliza para la obtención de la fibra desde hace unos 8000 años, la cual es conocida en México como *ixtle*, debido a sus características abrasivas y alto índice de retención de agua (65 %). La fibra se obtiene por tallado de la hoja constituida por un 15 por ciento de fibra y un 85 por ciento de pulpa (Hernández, 2006).

2.6.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *lechuguilla Torrey*

Nombres comunes: *Lechuguilla, maguey del cerro, pita, guishe.*

2.6.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Planta que forma rosetas pequeñas, muy suculenta, de color verde amarillento, de 50 a 70 cm de alto; sus hojas alcanzan una longitud que varía de 20 a 50 cm de acuerdo a la región y 3 cm de ancho. Nacen del centro del tronco, lo que da a la planta un aspecto de roseta. Son lanceoladas, encorvadas, sus bordes están protegidos por una serie de espinas ganchudas de color gris o café vueltas hacia la base de la hoja que va de 8-12 espinas que son de fácil desprendimiento; espina terminal fuerte, de 2-3.5 cm de largo, pardo-grisáceo (Figura 2); florece solo una vez entre los 6-15 años y entre los meses de Mayo a Agosto, a partir de un escapo floral al que denominan quiote o garrocha el cual llega a alcanzar alturas de 3 metros, las flores son producidas de dos en dos y son protegidas por vigorosas brácteas, son de color verde amarillo con matiz rojizo; su fruto es una cápsula café o negra; y sus semillas son numerosas, planas y brillantes y aunque son viables, la planta se reproduce de manera asexual (Martínez, 1979).

2.6.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es una planta de las zonas áridas y semiáridas, se puede encontrar desde el sur de Nuevo México y oeste de Texas además de muchas áreas de México, incluidos los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Estado de México e Hidalgo (Martínez, 1979).

2.6.5 HABITAT

La Lechuguilla prospera en suelos calizos, rocosos y arcillosos, es integrante del matorral desértico rosetófilo, con temperatura propia de clima seco de zonas áridas y semiáridas y precipitación pluvial entre 200-250 mm anuales, con una temperatura media anual de 19 a 25 °C; crecen a una altitud comprendida entre los 500 a 2500 metros sobre el nivel del mar. Se asocia con otras plantas como *Euphorbia antisyphilitica*, *Hechtia glomerata*, *Bouteloua breviseta*, *Larrea tridentata*, *Bouteloua curtipendula*, *Heteropogon contortus*, *Acacia constricta*, *Fouquieria splendens*, *Parthenium incanum*, *Opuntia sp.* y *Dasyilirion sp.*

2.6.6 USOS TRADICIONALES

En los estados de León, Tamaulipas y Zacatecas, se fabrican costales para maíz y café, mecates, cepillos, cordeles, tendedores y otros productos agrícolas; los desperdicios se aprovechan como abrasivos en la industria del vidrio, y en la elaboración de filtros para automóviles, tapetes y alfombras. También se ha preparado shampoo a partir de *A. lechuguilla*, de la que se aprovecha su propiedad para deshacer la grasa del cuero cabelludo. En el aspecto terapéutico se ha encontrado que se ha utilizado para golpes, heridas, diabetes, como diurético, mordeduras de serpiente, y el jugo de las hojas para espasmo del estómago, éste mismo se ha utilizado en papel de pared contra las termitas (Verastegui, 2000).

2.6.7 COMPOSICION QUIMICA

Aunque la composición química total del Agave no se conoce, en distintos trabajos se han reportado la presencia de esteroides, taninos, flavonoides, cumarinas, azúcares, insaturaciones y saponinas en sus hojas. Sin embargo, cabe mencionar que esta composición es variable de acuerdo con la edad de la planta, época de recolección y ubicación geográfica, entre otros factores (Verastegui, 2000).

La pulpa contiene compuestos bioactivos entre los que destacan las saponinas, con varias propiedades farmacológicas, las cuales se mencionan a continuación:

Las saponinas producen hemólisis en pequeñas concentraciones y están constituidas por grandes moléculas orgánicas, como esteroides o triterpenos, unidas a una o varios azúcares, por lo que contienen los elementos necesarios para emulsionar la grasa (Domínguez, 1988).

Verastegui en el 2000, investigó la actividad antimicrobiana de 4 plantas de la familia Agavaceae, incluida *A. lechuguilla*, sobre 9 especies bacterianas y 6 especies de hongos. Lo que mostró que *A. lechuguilla* presentó mayor actividad al inhibirlos con menor concentración sobre los dermatofitos probados, presentado las siguientes CMI: *Microsporum canis* (3.0 mg/dl), *Microsporum gypseum* (3.0 mg/dl) y *Trichophyton tonsurans* (3.5 mg/dl).

También encontró que una saponina esteroideal espirostánica era la responsable de la actividad antimicrobiana de las cuatro especies de Agave, principalmente en *A. picta*, la cual presentó mayor actividad antibacteriana.

A. lechuguilla es considerada una planta tóxica para animales como las cabras y ovejas que ingieren sus hojas, esta toxicidad es resultado de la acción de dos agentes uno fotosensibilizador de la piel y el otro con efectos sobre el hígado y los riñones (Aguilar, 1982). Los efectos tóxicos son atribuidos a las saponinas y a los pequeños cristales de oxalato de calcio que se encuentra en muchas especies (De la Torre, 2003). En el caso del hombre las intoxicaciones más frecuentes son por contacto con el vegetal aunque no se ha precisado el mecanismo de acción.

Además de su conocido efecto antimicrobiano y antifúngico, también se han realizados ensayos de citotoxicidad en *Artemia salina*, presentando el extracto etanólico de *A. lechuguilla* una dosis letal media (LD50) de 46.3 µg/mL, por lo cual puede ser considerado como un agente activo de acuerdo a Meyer (Saenz, 2000 y Ramos, 2006).

A. lechuguilla posee un gran potencial antifúngico, además de anticancerígeno, lo que puede ser una alternativa en el campo terapéutico (Verastegui, 2000). Debido a su conocida toxicidad, fue seleccionada para realizar los ensayos de citotoxicidad en este trabajo de investigación, con el objetivo de conocer si las células cultivadas en el medio control MEM y las cultivadas en el medio MCR muestran una respuesta citotóxica igual frente al extracto de prueba.

3. HIPOTESIS

Las células CHANG cultivadas en dos medios de cultivo MCR y MEM, presentan las mismas características morfológicas y respuesta citotóxica al ser expuestas al extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla* Torrey.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla* Torrey, sobre células CHANG cultivadas en dos medios de cultivo: MEM y MCR.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Obtener el extracto etanólico de *Agave lechuguilla* Torrey.
- 2.- Establecer la cinética de crecimiento celular en ambos medios.
- 3.-Evaluar la citotoxicidad del extracto sobre células CHANG cultivadas en MEM y MCR.
- 4.-Estudiar la morfología de las células CHANG cultivadas en MEM y MCR en presencia y ausencia del extracto etanólico de *A. lechuguilla*.

6. IMPORTANCIA

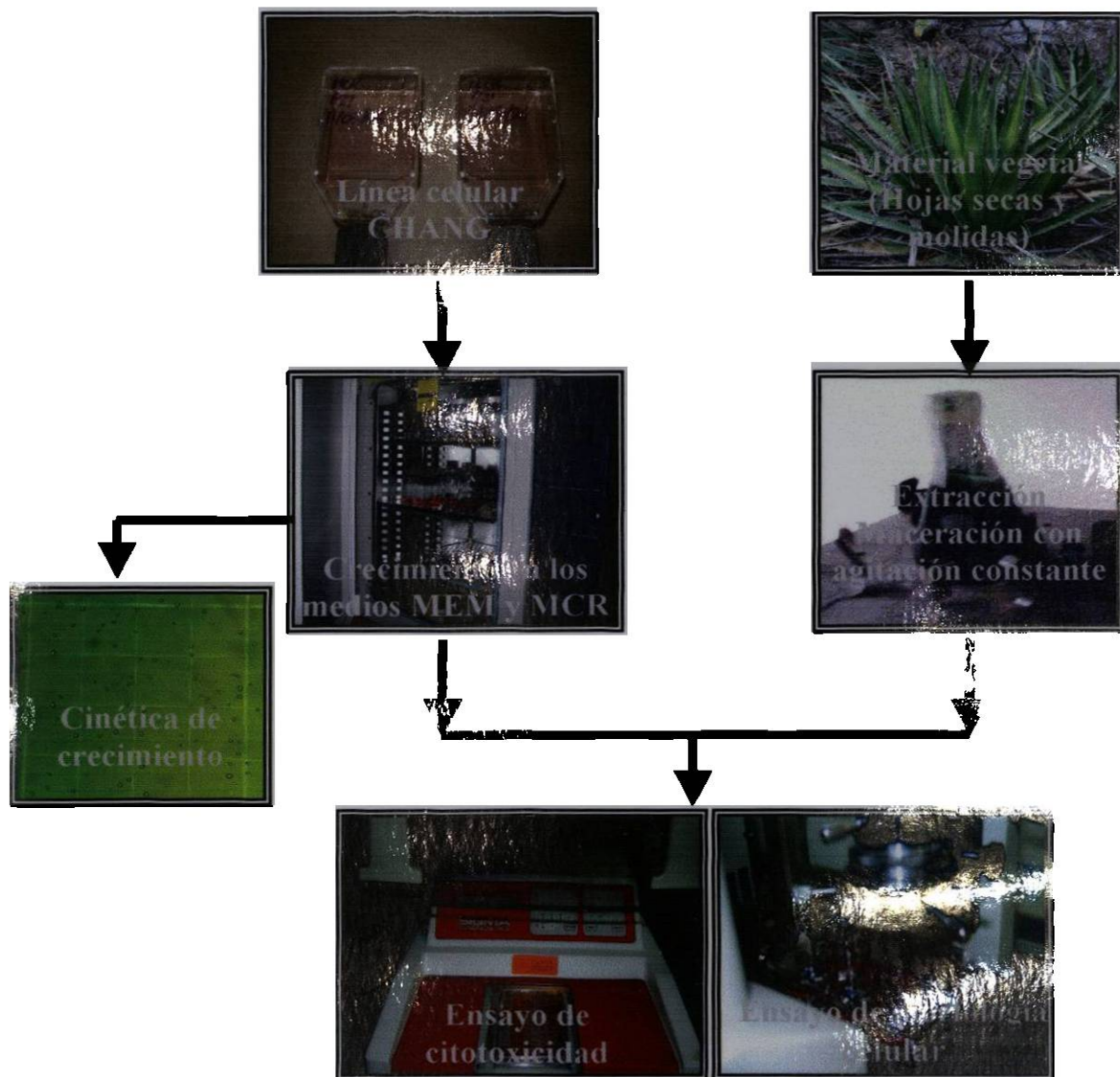
El diseño de nuevos medios de cultivo tales como el MCR, que ofrecen mantener las características fisiológicas de las células con respecto a las cultivadas en un medio comercial (MEM), al mismo tiempo que disminuyen el costo, es un tema de investigación actual. Por lo anterior, en este trabajo se estudió la citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla Torrey*, sobre células CHANG cultivadas en los medios de cultivo MEM y MCR, con la finalidad de contribuir a la caracterización del nuevo medio de cultivo MCR.

7. ORIGINALIDAD

La utilización de modelos celulares *in vitro* permite el estudio de diversos mecanismos que ocurren en procesos intracelulares e intercelulares que pasan a nivel molecular, bioquímico y fisiológico. Lo cual resulta difícil de estudiar en modelos más complejos. Tomando en cuenta que el medio de cultivo es un componente fundamental en el cultivo celular, la caracterización de un nuevo medio (MCR) que promueva el crecimiento celular de manera similar a como ocurre en un medio comercial (MEM), y que además sea más accesible por su costo, representa una alternativa en la investigación donde se emplea cultivos celulares.

8. MATERIAL Y METODOS

DIAGRAMA GENERAL



8.1 MATERIAL VEGETAL

8.1.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material investigado fue colectado en el mes de Enero, en la Sierra Madre a nivel del municipio de Santa Catarina.

La planta fue identificada en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y se le asignó un número de herbario.



Figura 3.- Sierra Madre a nivel del municipio de Santa Catarina, lugar de colecta de

A. lechuguilla.

8.1.2 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Después de secar a la sombra durante 8 días a temperatura ambiente, se realizó la trituración del material vegetal, en un molino, para facilitar la extracción. Se realizó una extracción etanólica, por la técnica de maceración a temperatura ambiente con agitación constante. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer 30 g del material vegetal en 250 mL de etanol, el cual se selló con un tapón de hule envuelto con aluminio y se colocó en un agitador Dual Action Shaker Lab Line, durante siete días, posteriormente se filtró y se retiró el solvente del extracto con ayuda de un rotavapor. El extracto obtenido se utilizó para la realización del ensayo de citotoxicidad y análisis morfológico sobre células CHANG crecidas en MEM y MCR.

8.2 MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS

8.2.1 CULTIVO DE LÍNEA CELULAR CHANG

Las células se cultivaron en el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) y en el Medio MCR, ambos suplementados con 10% de suero fetal de bovino, se sembraron las células en cajas Petri para cultivo celular de poliestireno de 35 mm X 10 mm (Corning). Se prepararon inóculos de 150,000 células/mL. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda hasta que las células formaron una monocapa confluyente. Ambos medios fueron suplementados con 1 mL de antibiótico (Penicilina 200,000UI/Estreptomina 0.5UI).

8.2.2 RESIEMBRA Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS

En condiciones estériles se retiró el medio de cultivo por medio de vacío de las cajas de cultivo que ya tenían formada la monocapa confluyente, a la cual se le realizaron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente se agregaron 0.2 ml de tripsina al 0.25 % y incubó por 8 min. a 37 °C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Después de este tiempo se agregaron 2 ml de medio con suero al 10%, se resuspendió y se centrifugó a 25 °C, 1000 rpm por 10 min. Utilizando vacío, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 1 ml de medio completo. Enseguida se tomó una alícuota y se contó en una cámara de Neubauer. Se sembraron 150,000 células/ml en la caja de cultivo, a la cual se adicionaron 2 ml del medio MEM o MCR según correspondía, posteriormente se incubó a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

8.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento de la línea celular CHANG en ambos medios MCR y MEM se llevó cabo durante 9 días con tres repeticiones por día, iniciando con inóculos de 5000 células/ml depositadas en cajas Petri de 35 X 10 mm, las cuales se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y en atmósfera húmeda. Cada 24 h se adicionó tripsina para despegar las células de tres cajas petri de cada línea celular crecida tanto en MEM como MCR y se contó el número de células, utilizando un hemocitómetro.

8.4 DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla* Torrey se evaluó mediante el método cuantitativo del WST-1. La determinación de la citotoxicidad se realizó en placas de 96 pozos. Por separado, se sembraron 5000 células por pozo en su medio de cultivo respectivo y se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂, posteriormente se adicionaron concentraciones crecientes del extracto (50, 100, 150 y 300 µg/ml). Los cultivos fueron incubados nuevamente a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. Después de 48 h se les añadió 10 µL del reactivo WST- 1 a cada uno de los pozos y se incubaron nuevamente por 1 h, bajo las mismas condiciones. Una vez transcurrida la incubación, se realizó la lectura en un lector de microplacas a 450 nm con un filtro diferencial de 600nm. La citotoxicidad se determinó calculando la media y desviación estándar de siete experimentos independientes, donde cada concentración se realizó por triplicado, se obtuvo el porcentaje de viabilidad con respecto al control negativo. El experimento se realizó por triplicado, empleando los controles respectivos: A) Células en medio MCR o MEM sin extracto, B) Medio más extracto, C) Medios sin células o extracto, D) Medios más WST-1 y E) Células en medio MCR o MEM mas Tritón X-100 0.1 %.

8.5 MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MEM Y MCR

Se cultivaron células CHANG en los medios de cultivo MEM y MCR sobre un cubreobjetos de vidrio en una microplaca de 6 pozos (CORNING) a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Después de que se formó la monocapa confluyente se adicionaron los extractos a las distintas concentraciones de 50, 100, 150 y 300 µg/ml y se dejó incubar otras 24 h bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se fijaron con metanol durante 10 min. Se dejaron secar y después se tiñeron durante 17 min con colorante Giemsa (SIGMA), después se retiró el colorante. Por último se montaron los cubreobjetos con las células teñidas en un portaobjetos con resina y se analizaron en el microscopio de luz utilizando el ocular de 40X.

9. RESULTADOS

9.1 NÚMERO DE HERBARIO

El número de folio 024761 le fue asignado al ejemplar de *Agave lechuguilla*, por el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, donde se guardó un ejemplar para archivarlo (Ver figura 4).

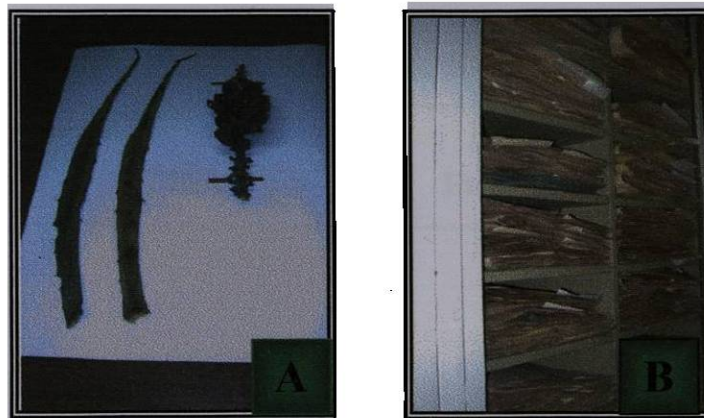


Figura 4.- A) Montaje de las hojas de *Agave lechuguilla* y B) forma de almacenamiento en el herbario.

9.2 RENDIMIENTO DE LA PLANTA

Extracto Etanólico

El cálculo del porcentaje de rendimiento obtenido de la planta se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de rendimiento} = (\text{Peso del extracto obtenido} / \text{Peso de la planta seca}) \times 100$$

Tabla 2.- Rendimiento de las hojas de *A. lechuguilla*.

Planta	Parte utilizada	Extracto	% de Rendimiento
<i>Agave lechuguilla</i>	Hoja	Etanólico	7.8

9.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

En la figura 5 se presenta el número de células en escala logarítmica (Base 10) frente al tiempo en que duró la cinética (9 días) de las células CHANG cultivadas en los medios de cultivo MEM y MCR. Las células crecidas en MEM presentan un tiempo de generación de 22 h, mientras que para las células cultivadas en MCR el tiempo de generación es de 24 h. El comportamiento de las células en ambos medios de acuerdo a datos estadísticos es diferente ($p > 0.05$).

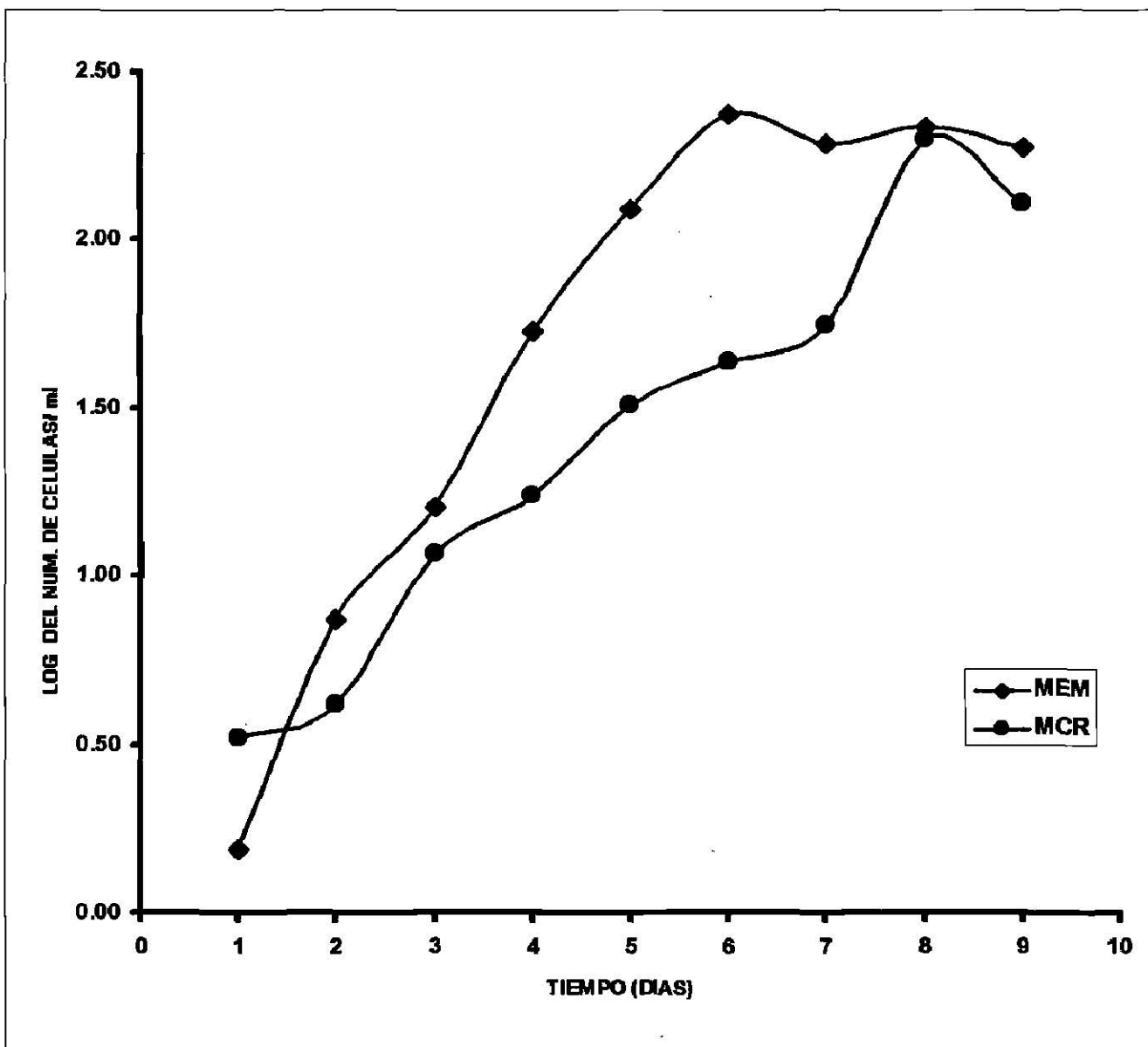


Figura 5.- Curva de crecimiento de la línea celular CHANG en dos medios de cultivo MEM y MCR. Relación entre el tiempo y log del numero de células /ml

9.4 EFECTO CITOTOXICO DE *A. lechuguilla* SOBRE LA LINEA CELULAR CHANG CULTIVADA EN MEDIO MEM Y MCR

En las figuras 6 y 7 se puede observar el efecto citotóxico de *A. lechuguilla*. Ahí se muestra que a medida que aumenta la dosis (50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$) el número de células disminuye comparada con el control negativo, este efecto se puede observar más notablemente a partir de la dosis de 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ en ambos medios.

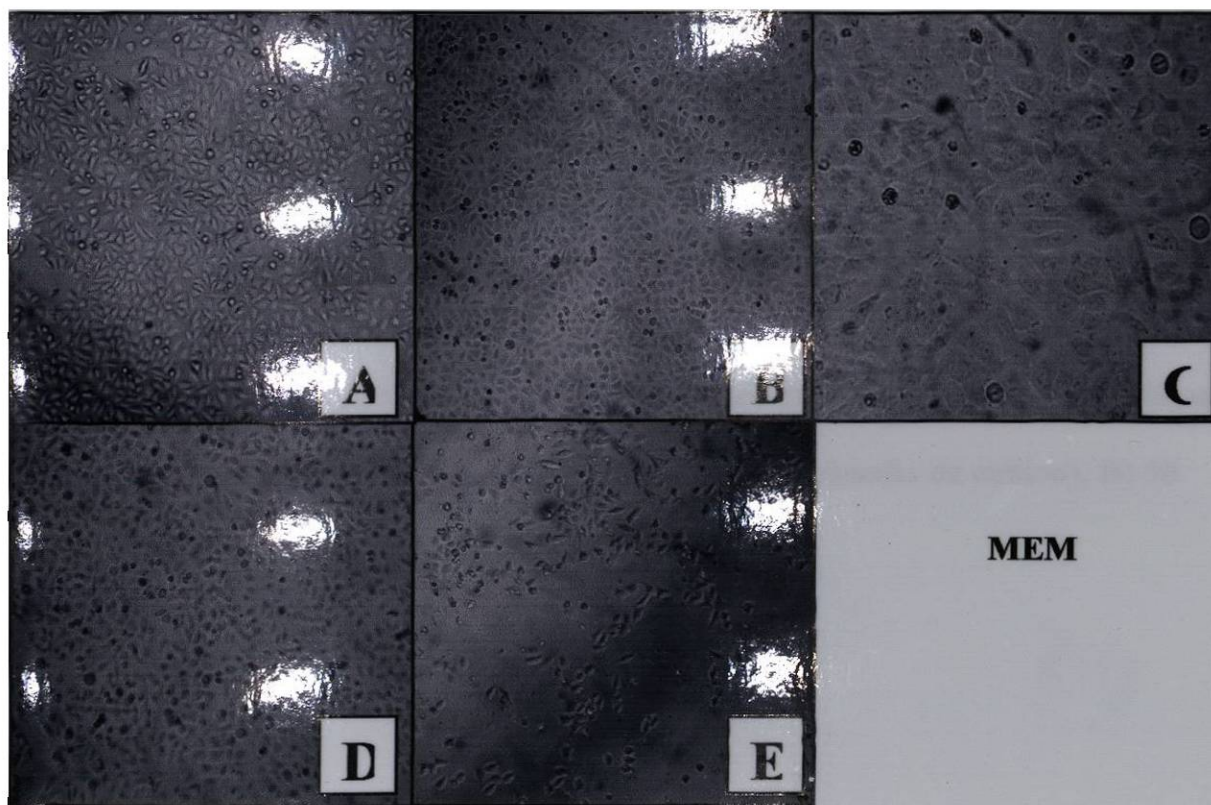


Figura No. 6.- Efecto citotóxico del extracto etanólico de *A. lechuguilla* sobre células CHANG cultivadas en el medio MEM; A) Control negativo (medio de cultivo), B) 50 $\mu\text{g/ml}$, C) 100 $\mu\text{g/ml}$, D) 150 $\mu\text{g/ml}$, E) 300 $\mu\text{g/ml}$.

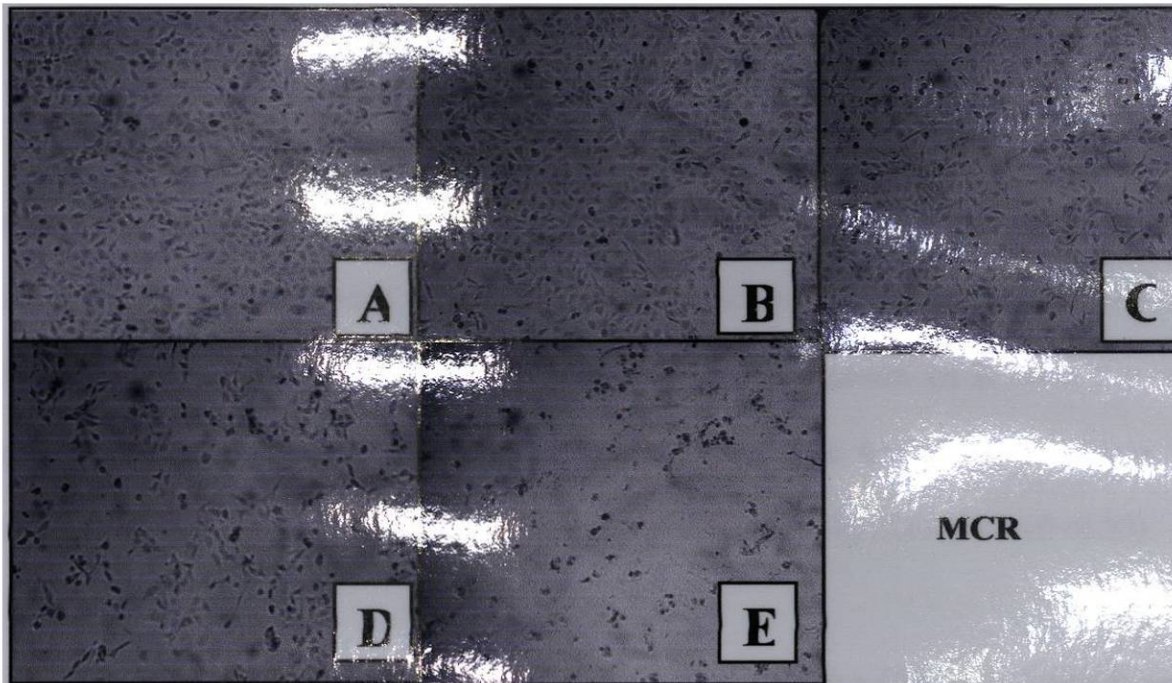


Figura No. 7.- Efecto citotóxico del extracto etanólico de *A. lechuguilla* sobre la línea CHANG crecida en el medio MCR; A) Control negativo (medio de cultivo), B) 50 µg/ml, C) 100 µg/ml, D) 150 µg/ml, E) 300 µg/ml.

9.4.1 EFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *A. lechuguilla* SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MEM Y MCR

Se presentó un bajo efecto citotóxico sobre las células CHANG al incubarlas en presencia del extracto etanólico de las hojas de *A. lechuguilla*, ya que se observó una disminución de la viabilidad a medida que aumentaban las concentraciones probadas (50, 100, 150 y 300 µg/ml) en ambos medios como se muestra en la tabla 3 y en la figura 8. Los resultados se analizaron mediante las pruebas Análisis de Varianza. Las diferencias entre ambos medios resultaron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Tabla 3.- Porcentajes de viabilidad mostradas por las células CHANG luego de ser incubadas con las diferentes concentraciones del extracto de *A. lechuguilla*

TRATAMIENTOS (µg/ml)	VIABILIDAD (%)	
	MEM	MCR
0 ^a	100	100
50	100	96
100	*83	*68
150	*68	*54
300	*43	*18
Tritón X-100 ^b	*9	*0

a) Control negativo; b) Control positivo

Con un asterisco se indican los tratamientos en los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células control negativo en medio de cultivo respectivo (sin extractos).

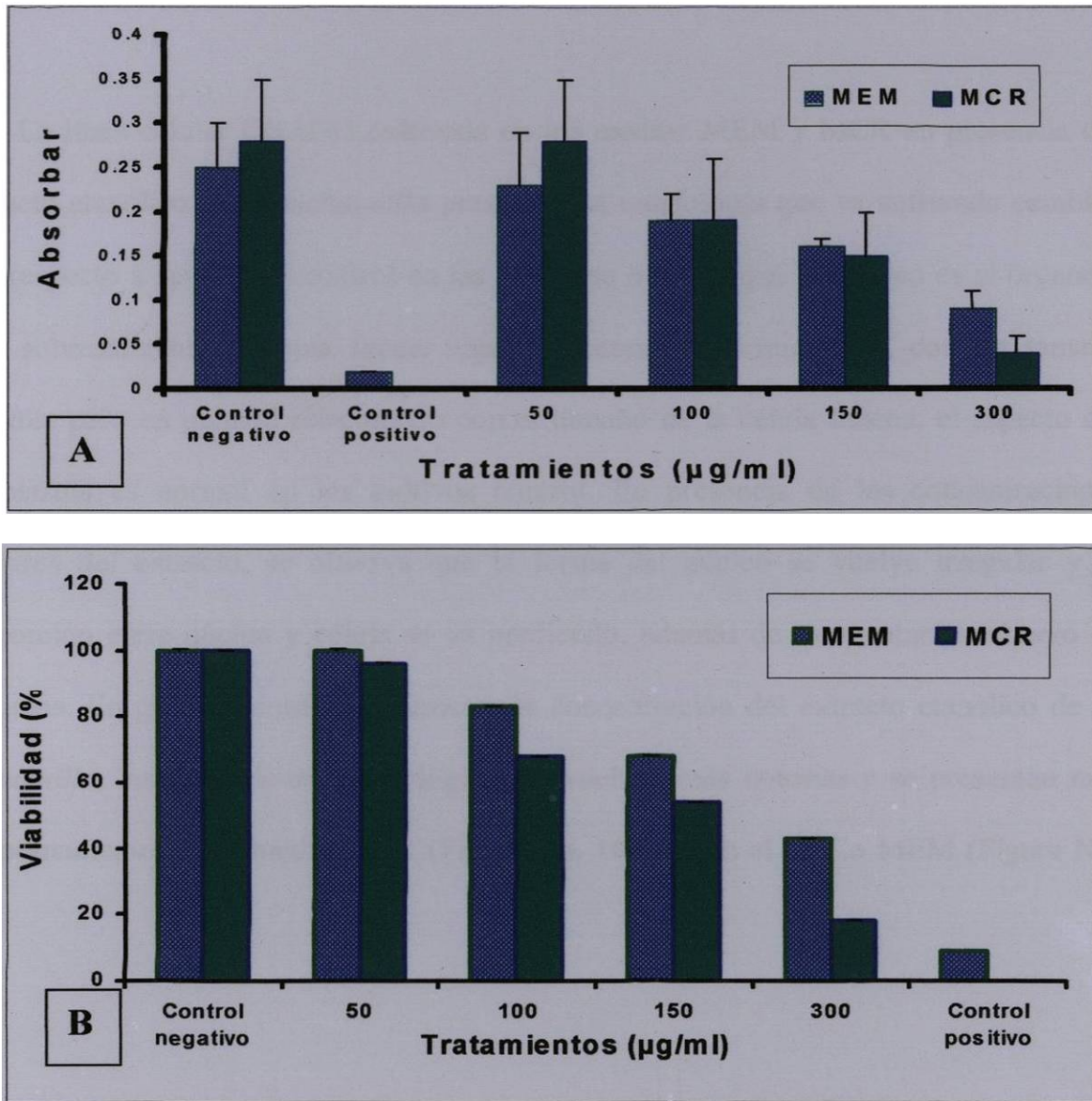


Figura 8.- Citotoxicidad del extracto etanólico de *A. lechuguilla* sobre la línea CHANG crecida en dos medios MEM y MCR en función de la absorbancia (A) y viabilidad (B).

9.5 MORFOLOGIA DE LA LINEA CHANG CRECIDA EN LOS MEDIOS MEM Y MCR.

La línea celular CHANG cultivada en los medios MEM y MCR en presencia del extracto etanólico de *A. lechuguilla* presenta una morfología que va sufriendo cambios con respecto a las células control en las cuales se observa que su núcleo es el organelo más sobresaliente, con una forma regular, presenta dos nucleolos, con un tamaño variable pero en general relacionado con el tamaño de la célula misma, el aspecto del citoplasma es normal en los cultivos control. En presencia de las concentraciones mayores del extracto, se observa que la forma del núcleo se vuelve irregular y la proporción entre núcleo y célula se va perdiendo, además de aumentar el número de vacuolas. En general, conforme aumenta la concentración del extracto etanólico de *A. lechuguilla*, las alteraciones morfológicas se vuelven más notorias y se presentan más tempranamente en el medio MCR (Figura No. 10) que en el medio MEM (Figura No. 9).

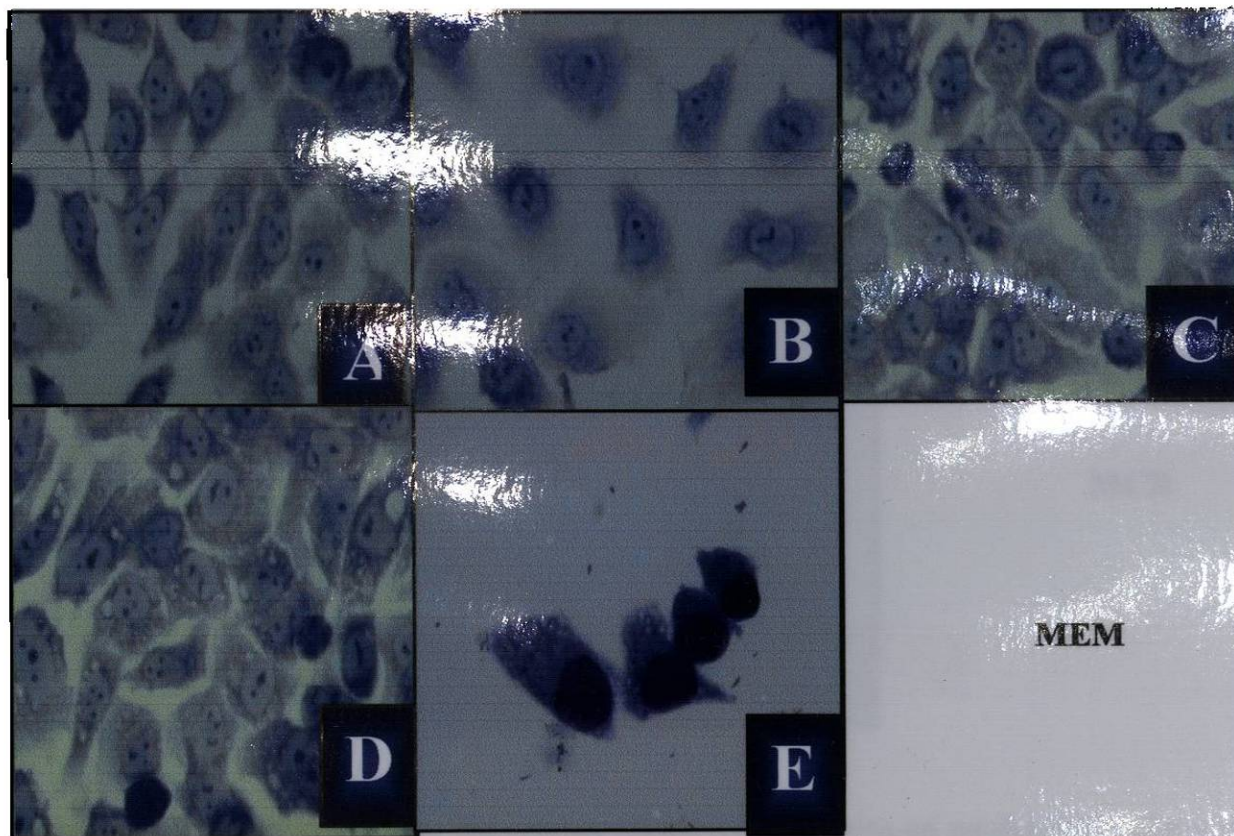


Figura No. 9.- Morfología de las células CHANG cultivadas en medio MEM con y sin extracto etanólico de *A. lechuguilla*: A) Control negativo (medio de cultivo), B) 50 $\mu\text{g/ml}$, C) 100 $\mu\text{g/ml}$, D) 150 $\mu\text{g/ml}$, E) 300 $\mu\text{g/ml}$.

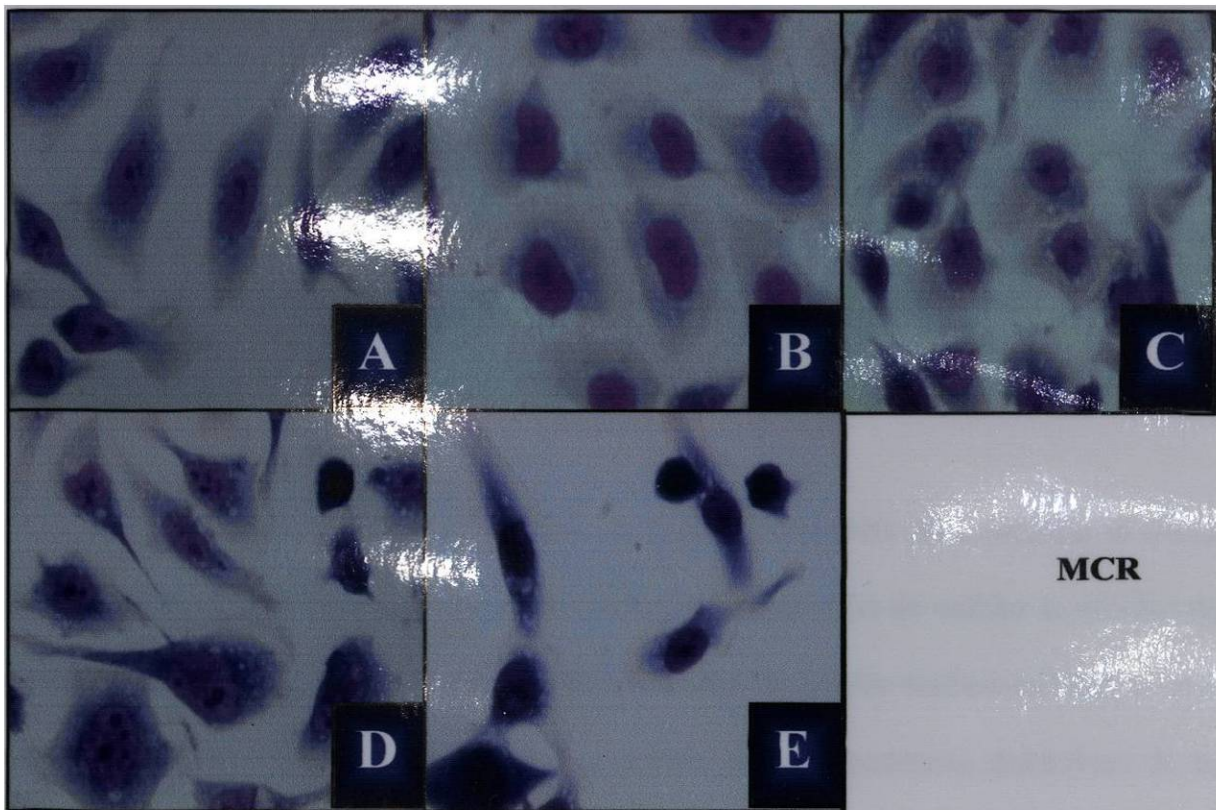


Figura No. 10.- Morfología de las células CHANG cultivadas en medio MCR con y sin extracto etanólico de *A. lechuguilla*: A) Control negativo (medio de cultivo), B) 50 µg/ml, C) 100 µg/ml, D) 150 µg/ml, E) 300 µg/ml.

10. DISCUSION

El cultivo celular es una herramienta muy importante en trabajos de investigación, en los que se pretende estudiar el funcionamiento de las células y organelos de manera integral, ya que se trabaja con poblaciones genética y fisiológicamente homogéneas (Mounolou, 2000).

En este trabajo utilizamos cultivos de células CHANG para estudiar el efecto citotóxico del extracto etanólico de *Agave lechuguilla* con el fin de validar la utilidad del nuevo medio de cultivo MCR en comparación con el medio tradicional MEM para determinar si favorece el crecimiento y conserva las características distintivas de las células CHANG cultivadas *in vitro*. Con respecto al crecimiento celular, a pesar de que la línea celular CHANG presentó tiempos de generación que caen dentro del rango normal de 12 a 24 h para células de mamífero (Karp, 1996), en este trabajo se encontró que el comportamiento de las cinéticas de crecimiento en los dos medios fue diferente en cuanto al rendimiento celular (ver figura 5). Las células cultivadas en el medio control (MEM) presentan un tiempo de generación de 22 h, mientras que en las células las crecidas en MCR el tiempo de generación es de 24 h ($p>0.05$).

Entre los factores que pudieron influir en esta diferencia son la falta de nutrientes, aumento de pH y temperatura. (Giese, 1975). En este trabajo, posiblemente el primer factor fue el que tuvo un papel importante en los resultados observados ya que si la concentración de nutrientes básicos es reducida, la velocidad de crecimiento se reduce también, probablemente por que el nutriente no está disponible o no puede transportarse dentro de la célula con la suficiente velocidad como la necesaria para un metabolismo activo, mientras que a concentraciones moderadas o altas de nutrientes, las velocidades de crecimiento no se ven afectadas (Madigan, 2000). Las células normales y las líneas celulares propagadas necesitan para crecer una considerable variedad de nutrientes como vitaminas, aminoácidos, cofactores, carbohidratos, sales, factores de crecimiento, hormonas, lípidos, entre otros (Eagle, 1955; Karp, 1996). Las células utilizan estos nutrientes para generar energía para llevar a cabo todas sus funciones o metabolitos precursores.

Por ello la preparación de un medio de cultivo es un proceso laborioso sin embargo, los componentes empleados en él deben de facilitar el crecimiento y la generación de las células, además de estar libres de organismos contaminantes exógenos que pueden influenciar la proliferación, morfología y fisiología de las células que se propaguen en ellos (Bu'lock, 1987).

Aunque se ha reportado que *A. lechuguilla* es considerada una planta tóxica para animales como las cabras y ovejas que ingieren sus hojas, la prueba de citotoxicidad reveló que el extracto etanólico de las hojas de *A. lechuguilla* presenta una baja citotoxicidad comparado con el presentado por el control positivo (Triton X-100) que presentó un 0% de viabilidad en MCR y un 9 % en MEM, sobre la línea celular CHANG crecida en ambos medios y es hasta la dosis de 300 µg/mL en la que se observa una reducción de células viables (ver figura 6 y 7) presentando viabilidades menores al 50% (MEM-48%; MCR-18%) (ver tabla 3).

Con respecto al estudio de morfología se encontró que la línea celular CHANG crecida en los medios MEM y MCR presenta una morfología que va sufriendo cambios con respecto a las células control ya que se observa que la forma del núcleo se vuelve irregular y la proporción entre núcleo y citoplasma se va perdiendo, además de presentar la formación de vacuolas conforme aumentan las concentraciones del extracto etanólico de *A. lechuguilla* (50, 100, 150 y 300 µg/ml), dicha diferencia se presenta mas tempranamente en el medio MCR (Figura No. 10) que en el medio MEM (Figura No. 9). Estas alteraciones pueden ser atribuidas principalmente a las saponinas que se han encontrado en muchas especies de Agavaceas (De la Torre, 2003), las cuales tienen varias propiedades farmacológicas como el producir hemólisis en pequeñas concentraciones (Domínguez, 1988).

Se han encontrado trabajos en los que las saponinas son las responsables de la actividad probada, por ejemplo Verastegui en el 2000, encontró que una saponina era la responsable de la actividad antimicrobiana de cuatro 4 plantas de la familia Agavaceae.

11. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto etanólico de las hojas de *Agave lechuguilla* con un rendimiento de 7.8 %.
- Las células crecidas en MEM presentan un tiempo de generación de 22 h, mientras que para las células cultivadas en MCR el tiempo de generación es de 24 h.
- El extracto etanólico de *Agave lechuguilla* presentó un efecto citotóxico desde la concentración de 100 µg/ml sobre la línea celular CHANG crecida en ambos medios.
- El extracto de las hojas de *A. lechuguilla* ocasiona cambios morfológicos dependientes de la dosis en las células de la línea CHANG propagada en ambos medios. Estos cambios se presentan más tempranamente en medio MCR.
- La línea celular CHANG crecida en MCR es más sensible al efecto del extracto de *A. lechuguilla*, que las propagadas en el medio control MEM.

- De acuerdo a los resultados obtenidos, el medio de cultivo MCR utilizado en este trabajo de investigación cubre las necesidades mínimas de la línea celular CHANG, lo cual también contribuye a que sean más sensibles al efecto del extracto etanólico de *A. lechuguilla*. En términos generales, el comportamiento observado del extracto sobre la línea celular propagada en el medio MCR, es semejante al presentado en el medio MEM. Sin embargo, se requieren más estudios para validar su utilidad real. De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que el medio MCR se puede utilizar para la realización de estudios generales como en la selección primaria de un grupo de plantas que les quiera determinar su efecto citotóxico, o en la práctica académica puede ser utilizado para iniciarse en el manejo de los cultivos celulares, ya que desde su preparación permitirá a los nuevos estudiantes conocer la composición de un medio básico para el cultivo de células de mamífero, lo cual puede ser a un menor costo, en comparación con empleo del MEM.

12. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar C. A. y C. Zolla. 1982. Plantas tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. Pp. 16-17.
- Alanís F. G. J., G. Cano y M. R. Merino. 1996. Vegetación y Flora de Nuevo León, una guía Botánico-Ecológica. Patronato Monterrey 400, Consejo Consultivo para la Preservación y Fomento de la Flora y Fauna Silvestre de Nuevo León, CEMEX. Monterrey, Nuevo León, México. Pp. 251.
- Balunas, M.J., A. Douglas Kinghom. 2005. Drug Discovery from Medicinal Plants. Life Sciences 78. Pp. 431-441.
- Bu`Lock, J. et. al. 1987. Biotecnología Básica. Editorial Acribia. Pp.509-515.
- Callen, Jean-Claude. 2000. Biología Celular. De las moléculas a los organismos. Editorial Continental. México. Pp 63-64
- Casillas, R.F. 2006. Evaluación de la Actividad Antineoplásica de Plantas Tóxicas del Noreste del Norte de México. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. En proceso. México.
- Domínguez, X. A. 1988. Métodos de Investigación Fotoquímica. Pp: 149 –151.
- Durán, R.; A. Valle; X. Viña y B. Mujica. 2004. Importancia biológica del mantenimiento de líneas celulares estables. II. Cultivos. Revista Digital CENIAP HOY Número Especial 2004. Maracay, Aragua, Venezuela. URL: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/duran_r1/arti/duran_r1.htm.

- Eagle, H. 1955. The specific amino acid requirements cell cultures. *Journal of Science*. Pp. 130: 432.
- Espinosa A. G. 2005. Diseño de un medio de cultivo con peptona de colágeno como fuente de nitrógeno para la propagación in vitro de células de mamífero. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. En proceso. México.
- Freshney R. 2000. *Culture of Animal Cells a manual of basic technique*. Wiley-Liss. Pp. 105 – 120.
- Freshney, 1987. *Cultura of Animal Cells a Manual of Basic Technique*. Alan. R. Liss, Inc. Pp.71-77.
- Ham R.G. McKeehan. W.L., 1979. Media and growth requirements. In Jakokoby. W.B., Pastan. I.H.: *Methods in Enzymology*. Volume LVIII. Cell Culture. Academia Press. New Cork. Pp. 44 – 93.
- Hayashi, M. et.al. 1995. Artificial Cell-spreading of Permeabilized BHK Cells on Fibronectin-coated Substratum. *Cell structure and function* 20. Pp. 311-317.
- Izco, J., 2004. *Botánica*. MacGraw-Hill Interamericana. Pp. 473.
- Junqueira, L.C. y J.Carneiro.1998. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill. Pp. 39-41.
- Karp, G. 1996. *Biología Celular*. McGraw-Hill. Pp. 705-713.
- Leos, R. C. 2005. Evaluación de la citotoxicidad de 3 extractos vegetales líneas celulares utilizando el nuevo medio de cultivo MCR. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. México.

- Martínez M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Cultura Económica. Pp. 532:1041.
- Moscona, A.A. 1952. Cell Suspension from organ rudiments of chick embryos. Exp. Cell Pp. 3:535
- Mosmann T.1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. Pp. 65: 55-63.
- Saenz, M.T, M.D. García, A. Quilez y M.C. Ahumada. 2000. Cytotoxic Activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) y *Cissus sycyoides* L. (Vitaceae). Phytotherapy research. Pp. 14; 552 – 554.
- Sigma 2003-2004. Productos para la Investigación en Ciencias de la Vida. Pp. 312
- Verastegui, M., M. de los A. 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de agaves y su acción sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. México.

12.1 INTERNET

- Hernández S.R., Eugenia C. Lugo C., Lourdes Díaz J., Socorro Villanueva. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. 2006. Revista Digital, Científica y Tecnológica. Artículo Núm.42. <http://www.e-gnosis.udg.mx/investigación.html>.
- Reyes Agüero, J. A., J. R. Aguirre Rivera, C. B. Peña Valdivia. Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. Sociedad Botánica de México. <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen651.html>
- Investigación y desarrollo. Exporte shampoo elaborado por indígenas. 1999. <http://www.invdes.com.mx/anteriores/Mayo1999/htm/sham.html>

