



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

**Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**

EFFECTO CITOTÓXICO *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE *Tagetes erecta* L. EN  
CÉLULAS HeLa

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

PRESENTA

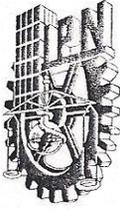
Biol. Yadira Rivera Ramírez

Directoras

Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez  
Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo



Yautepec, Morelos; Diciembre 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 13:00 horas del día 7 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:

EFFECTO CITOTÓXICO IN VITRO DE EXTRACTOS DE *Tagetes erecta* L. EN CÉLULAS HeLa

Presentada por el alumno:

<u>Rivera</u>	<u>Ramírez</u>	<u>Yadira</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	3	9	1
---	---	---	---	---	---	---

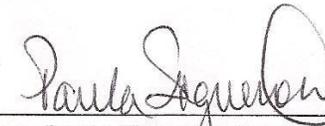
aspirante de:

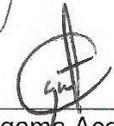
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

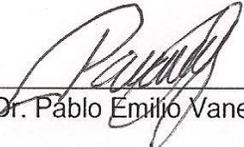
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

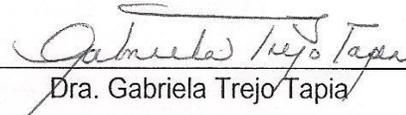
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alma Angélica Del Villar  
Martínez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Paula Figueroa Arredondo

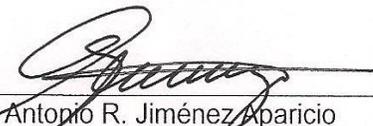
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Edith Agama Acevedo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Pablo Emilio Vanegas Espinoza

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gabriela Trejo Tapia

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio



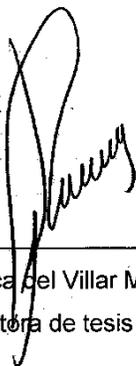
SEP IPN  
CENTRO DE DESARROLLO  
DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
YAUTEPEC, MOR.

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "Efecto citotóxico *in vitro* de extractos de *Tagetes erecta* L. en células HeLa" es responsabilidad del la Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez, de la Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo y de la Biol. Yadira Rivera Ramírez y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

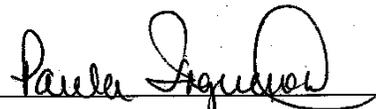
Yautepec, Mor., 5 de diciembre del 2011.

ATENTAMENTE



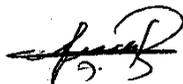
---

Dra. Alma Angélica del Villar Martínez  
Directora de tesis



---

Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo  
Directora de tesis



---

Biol. Yadira Rivera Ramírez  
Alumna



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Yauatepec, Morelos siendo el día 5 del mes de Diciembre del año 2011, la que suscribe Biol. Yadira Rivera Ramírez, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B091391, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del la Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez y la Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo y cede los derechos del trabajo intitulado "Efecto citotóxico *in vitro* de extractos de *Tagetes erecta* L. en células HeLa", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o director (es) del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6, Calle Ceprobi número 8; Colonia San Isidro, C.P. 62731 Yauatepec, Morelos, México, Fax: 01-(52Intl.) (735) 394 20 20 ó 01-(55) 57 29 70 00 extensión 82512, e-mail: ceprobi@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Biol. Yadira Rivera Ramírez

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez**, por la oportunidad que me dio de formar parte del Laboratorio de Biología Molecular, por el apoyo, la orientación y las sugerencias en el transcurso de este trabajo.

A la **Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo**, por aceptar formar parte de este proyecto, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio, por las observaciones, recomendaciones, sugerencias en el transcurso del mismo.

Al **Dr. Pablo Emilio Vanegas Espinoza**, gracias por el apoyo brindado, por la ayuda, sugerencias y consejos en la realización de este trabajo.

A el **M en B. Víctor Hugo Rosales García** por su experta colaboración en la obtención de los resultados de citometría de flujo, realizados en la Unidad de Citometria de flujo de los laboratorios centrales del Cinvestav Zacatenco.

Al **Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio**, por su asesoría, apoyo y el interés demostrado durante todas las juntas para la revisión del trabajo.

A la **Dra. Edhit Agama Acevedo**, por sus atinadas observaciones durante la revisión de la tesis.

A la **Dra. Gabriela Trejo Tapia** por sus observaciones y sugerencias para la revisión del trabajo.

A la **Dra. Brenda Camacho Díaz** por el apoyo, la atención y las sugerencias en este trabajo, pero sobre todo por los consejos y los conocimientos brindados. Muchas gracias.

A la **M. C. Ana Laura Luna**, por brindarme su conocimiento, por todo el apoyo y las molestias causadas.

A **Miguel y Julio** del laboratorio de microbiología molecular por la ayuda y el apoyo brindado.

Al **Dr. Francisco Heredia y a la Dra, Isabel Vicario** de la Universidad de Sevilla, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio.

A **Carla** por enseñarme la parte de HPLC, y por las buenas charlas en aquellos días de trabajo en Sevilla.

A mis amigos y compañeros del Ceprobi: Vero, Meli, Jann, Bett, Nadis, Gus, Jaime, Ricky, Mari G., Orbe, Santi, Chucho, Lupita, Vikcy, Viri, Mario, Isra S., Fer, Víctor, Sandra, Isai, Isra, Ángeles, Perla, Margarito, al Dr. Javier Solorza y especialmente a Michel por todo su apoyo.

Gracias a todos por su amistad.....

## DEDICATORIAS

A Dios por estar en todo momento de mi vida.

A mi mamá....

Por entenderme y brindarme su apoyo y cariño en todo momento, por enseñarme a ser valiente y a luchar por mis objetivos.

Gracias por ser mi madre y mi padre a la vez.

La amo.....

A mis hermanas Bere y Lili....

Por su apoyo, su cariño, comprensión y por estar siempre cerca echándome porras.

Las quiero hermanas .....

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez y la Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional; parte del trabajo experimental se desarrollo en la Unidad de Citometría de Flujo de los Laboratorios Centrales del CINVESTAV-Zacatenco y se realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de la beca CONACYT (232042), beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI). La investigación fue realizada con el financiamiento económico del proyecto de la Secretaría de investigación y Posgrado del IPN (SIP-20113742 ) y la Beca-Tesis Terminal del IPN institucional para la conclusión del trabajo.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>ABREVIATURAS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 Generalidades del cempaxúchil ( <i>Tagetes erecta</i> L.)	4
2.1.1 Descripción botánica	4
2.1.2 Usos y propiedades curativas de <i>Tagetes erecta</i> L.	6
2.1.3 Carotenoides en <i>Tagetes erecta</i> L.	8
2.2 Generalidades de carotenoides	9
2.2.1 Estructura de los carotenoides	10
2.2.2 Actividad biológica de los carotenoides	12
2.2.3 Importancia de los carotenoides en la prevención de enfermedades	13
2.3 Cultivo de tejidos vegetales	14
2.3.1 Proceso de desdiferenciación <i>in vitro</i>	16
2.4 Cultivos celulares derivados de cáncer	16
2.4.1 Cáncer cérvicouterino	17
2.4.2 Línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa)	18

2.5 Mecanismos que inhiben o retardan el crecimiento celular	18
2.5.1 Muerte celular	19
2.6 Tratamiento digital de imágenes como herramienta para caracterizar procesos	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>IV. HIPOTESIS</b>	23
<b>V. OBJETIVOS</b>	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
<b>VI. DIAGRAMA GENERAL</b>	25
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
7.1 Material biológico	26
7.2 Obtención de extractos de carotenoides a partir de lígulas y callo de <i>Tagetes erecta</i> .	26
7.3 Identificación de pigmentos por espectrofotometría	27
7.4 Obtención del estándar de luteína a partir de lígulas de cempaxúchil	27
7.5 Análisis de carotenoides de cempaxúchil por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	28
7.6 Cultivo de línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa)	28
7.7 Método para la cuantificación de la viabilidad celular	29
7.8 Análisis estadístico de la viabilidad de células HeLa	30
7.9 Tinción con anexina V-FITC/yoduro de propidio para la detección de apoptosis	31
7.10 Tratamiento digital de imágenes	34

<b>XIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	35
8.1 Obtención de extractos de lígula y callo de cempaxúchil y caracterización espectrofotométrica	35
8.2 Análisis del extracto de lígula y callo de cempaxúchil mediante HPLC	35
8.3 Determinación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano.	42
8.4 Detección de apoptosis y necrosis por el método de anexina-VFITC/yoduro de propidio.	44
8.5 Tratamiento digital de imágenes (TDI) de células HeLa	48
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	52
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	53
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1.	Imágenes de algunas especies del género <i>Tagetes</i>	5
2.	Semillas, planta y tipos de inflorescencias de <i>Tagetes erecta</i> L. se clasifican en tres categorías dependiendo el tipo flores individuales: en margarita, intermedio y pompón (Serrato-Cruz, 2006).	7
3.	Estructura química de la luteína (Tomada de: Del Villar-Martínez y col., 2007).	9
4.	Estructuras químicas de fitoeno, licopeno, $\beta$ - caroteno, luteína, zaxantina, astaxantina y violaxantina (Del Villar y col., 2007 y Sandman, 2001).	11
5.	Diagrama general de la estrategia experimental.	25
6.	Amplificación del cuadrante de una cámara de Neubauer (los cuadrantes están marcados como A, B, C y D).	31
7.	Representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC.	33
8.	Perfil espectrofotométrico de los extractos de lígula de cempaxúchil, diluido en acetona 1:100. 1) trans-luteína, 2) 13-cis-luteína y 3) 9,9-cis-luteína.	36 36
9.	Espectro de absorción de los extractos de callo de cempaxúchil diluido en acetona 1:10. 1) trans-luteína, 2) 13-cis-luteína y 3) 9,9-cis-luteína.	37
10.	Perfil cromatográfico de extractos de lígula de cempaxúchil. A) Luteína (tiempo de retención = 23.22 min) y zeaxantina (tiempo de retención = 27.32 min) y sus respectivos espectros de absorción, B) luteína y C) zeaxantina.	38

11. Perfil cromatográfico de extractos de callo de cempaxúchil. A) Luteína (tiempo de retención = 23.51 min) y zeaxantina (tiempo de retención = 27.67 min) y sus respectivos espectros de absorción, B) luteína y C) zeaxantina. 39
12. Curva de calibración para calcular la concentración de luteína en las muestras analizadas. 40
13. Viabilidad celular con azul de tripano. Efecto de los extractos lígula de cempaxúchil sobre la viabilidad celular de la línea HeLa. 43
14. Efecto del extracto de callo y lígula en la línea celular de cáncer cérvicouterino (Hela) sobre la muerte celular programada (Apoptosis). Células necróticas (Cuadrante 1), células en apoptosis tardía (Cuadrante 2), células en apoptosis temprana (Cuadrante 4) y células viables (Cuadrante 3). 47
15. Micrografías del extracto de callo y lígula, el control negativo y los controles con Taxol (1 µg/ml) y actinomicina sobre la viabilidad celular de la línea de cáncer Cérvicouterino (HeLa). 50

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Tabla	Página
1.	Estudios del efecto de fotoquímicos bioactivos en líneas celulares de cáncer.	15
2.	Contenido de luteína en extractos lígula y callo de cempaxúchil determinado por HPLC.	41
3.	Viabilidad celular, apoptosis y necrosis de células HeLa.	46
4.	Datos del área, perímetro, circularidad y diámetro de Feret de células vivas en los distintos tratamientos con sus respectivos controles. Media $\pm$ error estándar	51

## ABREVIATURAS

<i>T. erecta</i>	<i>Tagetes erecta</i>
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
IPP	Isopentil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
FPP	Farnesil pirofosfato
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
TDI	Tratamiento digital de imágenes
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	Benciladenina
° C	Grados centígrados
KOH	Hidróxido de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
EP	Éter de petróleo
MeOH	Metanol
TBME	Metil-t-butil éter
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
PBS	Buffer de fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)
HEPES	hidroxietilpiperazina -N-2- etanosulfónico
SFB	Suero fetal bovino
FITIC	isiotiocianato de fluoresceína
ml	Mililitro
µl	Microlitro
g	Gramo
min	Minutos
nm	Nanómetros
µg/ml	Microgramos/mililitro
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
mm	Milímetros
%	Porcentaje
TIF	Tagged-Image File Format

## RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos naturales que están asociados con la disminución del riesgo de contraer cáncer y enfermedades cardiovasculares debido a su capacidad antioxidante. El cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.) es conocido por su elevado contenido de carotenoides, en donde la luteína representa del 80 al 90% en las lígulas. Debido a que no hay evidencia previa de la actividad de los extractos de cempaxúchil a nivel celular, en este trabajo se evaluó el efecto (citotoxicidad o proliferación celular) de los extractos de cempaxúchil sobre la línea celular HeLa (línea celular derivada de cáncer cérvicouterino: Henrietta Lacks). Se obtuvieron extractos de lígulas y de callo de cempaxúchil, se caracterizaron los extractos por HPLC y se probaron diferentes concentraciones de los mismos sobre la línea celular. Los resultados muestran que las células HeLa expuestas a diferentes concentraciones del extracto de lígula (25 y 6.25 µg/ml) y callo (25 y 12.5 µg/ml), provocan cambios morfológicos. Los resultados que se obtuvieron en las pruebas de anexina V, indican que los tratamientos con los extractos empleados no estimulan la proliferación de las células HeLa y se sugiere que los extractos tienen una actividad quimioprotectora, ya que inducen muerte del tipo apoptosis en bajo porcentaje. Con el trabajo realizado se sugiere que la actividad de los pigmentos de cempaxúchil, lígula y callo sobre los cultivos de células HeLa es como agente químico protector; debido a que se observó un bajo porcentaje de apoptosis, lo que indica que al ser aplicados no se promueven un proceso de tipo inflamatorio, como ocurriría en caso de necrosis, donde la liberación del contenido celular provoca la inflamación de los tejidos.

## ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments that are associated with decreased risk of cancer and cardiovascular diseases due to its antioxidant capacity. Marigold (*Tagetes erecta* L.) is known for its high content of carotenoids, corresponding to lutein 80-90% in florets. Because there is no previous evidence of the activity of marigold extracts at cellular level, this study evaluated the extracts effect (cytotoxicity or cell proliferation) on HeLa cell line (cell line derived from cervical cancer: Henrietta Lacks). Extracts from ligule and callus of marigold were obtained, they were characterized by HPLC and different concentrations were tested over the cell line. Results show that HeLa cells exposed to different concentrations of ligule (25 and 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and callus (25 and 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) extracts, cause morphological changes. Obtained results in annexin V tests indicated that used extracts as treatments, did not stimulate HeLa cells proliferation, suggesting that extracts have chemoprotective activity, inducing apoptosis in low percentage. With the work suggests that the activity of the pigments marigold, ligules and callus cultures of HeLa cells is protective chemical agent, because there was a low percentage of apoptosis, indicating that not being applied promote an inflammatory process, as would happen in case of necrosis, where the release of cell contents inflation causes the tissues. This work suggests that activity of marigold pigments, from ligule and callus cultures, over HeLa cells, is as protective chemical agent, because there were low percentage of apoptosis, indicating that when applied not promoted an inflammatory process, as would happen in case of necrosis, where the release of cell contents causes inflammation of tissues.

## I. INTRODUCCIÓN

En México existe una gran variedad de especies de plantas que constituyen una fuente inexplorada de principios activos. Tal es el caso del cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.) la cual es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Asteraceae y es originaria de México, se usa como planta ornamental y en la medicina tradicional mexicana. Es cultivada debido a que sus inflorescencias, constituyen una fuente importante de carotenoides; tales como xantófilas (luteína y zeaxantina). Por otro lado, se ha reportado la obtención de células desdiferenciadas (callo) de cempaxúchil, que presenta la producción de distintos carotenoides.

Los carotenoides son un grupo de compuestos que juegan un papel importante como antioxidantes y se ha reportado que intervienen en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer entre otros. Estudios epidemiológicos sugieren que el incremento en la ingesta de frutas, vegetales y de otros alimentos que contienen carotenoides puede proteger contra el daño al DNA que llega a iniciar el desarrollo de células cancerosas. Además, se ha sugerido que inducen y estimulan la comunicación intercelular, que a su vez juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular y apoptosis. En estudios recientes se ha observado que mediante la ingesta de luteína/zeaxantina y otros carotenoides se reducen el riesgo de padecer cáncer de colon, de pulmón, de mama y cérvicouterino, en estudios independientes. Sin embargo, no hay evidencias de la actividad a nivel celular de los extractos de lígula y callo de cempaxúchil. En este trabajo se utilizó como modelo de estudio a la línea celular HeLa (cáncer cérvicouterino). El trabajo se enfocó en conocer el efecto de los extractos de cempaxúchil sobre células HeLa, en donde se observó la inhibición del crecimiento celular y se sugiere un efecto quimioprotector que reduce el riesgo de generar procesos inflamatorios.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.)

En México existe una gran variedad de especies de plantas que constituyen una fuente inexplorada de principios activos, tal es el caso del cempaxúchil (Naranjo-Modad y col., 2000). El cempaxúchil pertenece a la clase Magnoliopsidae, la subclase Dicotiledoneae, al orden Asterales, a la familia Asteraceae, al género *Tagetes*. La cual es nativa del continente americano (Serratro-Cruz, 2006).

En México se ubica el área de mayor diversidad de especies del género *Tagetes* (Tun Suárez, 1990) y los estados en donde se puede encontrar son; Chiapas, Morelos, Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Yucatán (Jasso y col., 2006)

El género *Tagetes* está formado por aproximadamente 60 especies, entre las más comunes se encuentran: *Tagetes erecta*, *T. lunulata*, *T. patula*, *T. tenuifolia* y *T. lucida* (Figura 1). La especie más popular es *T. erecta*, por sus inflorescencias grandes y amarillas o anaranjadas que son las que se utilizan comúnmente en ceremonias de Día de Muertos (Serrato-Cruz, 2004). Son un importante recurso genético potencial para la agroindustria, horticultura ornamental y medicina en México (Serrato-Cruz y Quijano, 1994).

#### 2.1.1 Descripción botánica

El cempaxúchil es una planta herbácea anual, erecta muy aromática, de tallos estriados y hojas pinnadas, con flores agrupadas en capítulos, inflorescencias que a su vez contienen numerosas flores individuales (Serrato-Cruz, 2006), que van del color amarillo claro hasta un anaranjado intenso, esta gama de colores se debe a la presencia de diversos carotenoides (Soule, 1993; Delgado-Vargas y Paredes-López O. 2003; Martínez-Peña y col., 2004; Navarrete-Bolaños y col., 2005).



***Tagetes tenuifolia***



***Tagetes patula***



***Tagetes lunulata***



***Tagetes erecta***



***Tagetes lucida***

**Figura 1.** Imágenes de algunas especies del género *Tagetes*

Las inflorescencias se clasifican en tres categorías dependiendo de la composición de sus flores individuales (Figura 2) el tipo pompón o doble, con flores 100% liguladas, el tipo intermedio, con flores liguladas, y tubulares, finalmente el tipo sencillo o margarita, con más del 90% de flores tubulares y algunas liguladas en la periferia de la cabezuela (Galicia, 1994). Actualmente, las inflorescencias del cempaxúchil que acumulan carotenoides tienen aplicación medicinal (Giuliano y col., 2008) ya que mediante estudios epidemiológicos se ha encontrado que la luteína tiene efectos benéficos para la salud (Chew y col., 1996)

### **2.1.2 Usos y propiedades curativas de *Tagetes erecta* L.**

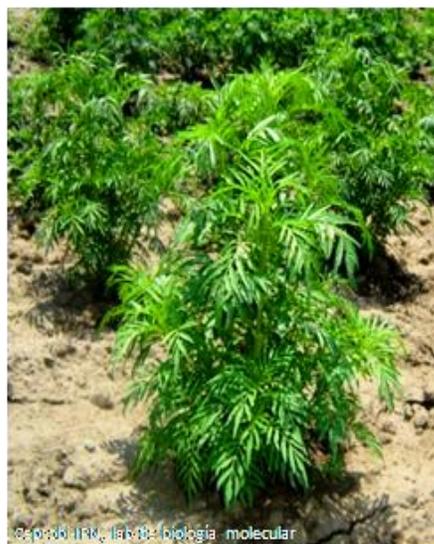
El cempaxúchil se considera una planta comercialmente importante debido a que se cultiva para utilizarla como planta ornamental (flor de corte, jardín y maceta), tradicionalmente en ceremonias religiosas relacionadas con el día de muertos, también es utilizada como complemento alimenticio de aves, peces y crustáceos y para consumo humano, donde provocan algún efecto benéfico en la salud humana por su alto contenido de moléculas antioxidantes y anti-cancerígenos (Serrato-Cruz, 2004).

En la medicina tradicional, el cempaxúchil se ha utilizado como antiespasmódico y antiparasitario, en el tratamiento de enfermedades del bazo e hígado (Delgado-Vargas y col., 2000), comúnmente las infusiones de lígulas y de hojas se usan para tratar trastornos estomacales (cólicos) (Martínez, 1993) así como afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión y contra parásitos intestinales.



Giuseppe Mazza

**semillas**



Ceprubi-IPN, lab de biología molecular

**Planta**



<http://www.seedsofchange.com>

**Tipo margarita**



Ceprubi-IPN, lab de biología molecular

**Tipo pompón**



<http://www.hort.comell.edu/4hplants/Flowers/>

**Tipo intermedio**

**Figura 2.** Semillas, planta y tipos de inflorescencias de *Tagetes erecta* L., se clasifican en tres categorías dependiendo del tipo de flores individuales: en margarita, intermedio y pompón (Serrato-Cruz, 2006).

Además, el género *Tagetes* contiene compuestos bioactivos en las diferentes partes de la planta que presentan actividad nematicida, fungicida y larvicida; (Vasudevan y col., 1997) por ejemplo las piretrinas son responsables de los efectos contra insectos. Otras sustancias en *Tagetes* que actúan como nematicidas son los taninos (Martínez, 1993), tiofeno, oleorseina y xantófilas (Jasso y col., 2006).

Por otro lado, los aceites de *T. erecta* actúan contra infecciones causadas por hongos, y los extractos acuosos de inflorescencias secas de *T. erecta* se han empleado para atender algunos tipos de úlceras en los ojos (Serrato- Cruz, 2004).

Las lígulas son una excelente e importante fuente de carotenoides ya que acumulan 20 veces más que las hojas y proporcionan un excelente sistema para investigar las propiedades nutraceuticas de estas plantas (Moehs y col., 2001).

El estudio del cempaxúchil y de sus propiedades medicinales es amplio, lo que ha dado pie a su investigación en diferentes áreas, para la obtención de un mayor conocimiento y aprovechamiento de este recurso.

### **2.1.3 Carotenoides en *Tagetes erecta* L.**

Los carotenoides que se encuentran en cempaxúchil son las xantófilas; luteína y zeaxantina (Handelman, 2001), siendo la luteína el más abundante (Mares-Pelman y col., 2002) ya que se encuentra entre un 80-95% del contenido total de carotenoides. Además de ser responsable de la coloración amarilla intensa de las lígulas (Alves-Rodriguez y Shao, 2004).

Este carotenoide se presenta en forma de ésteres de ácidos grasos con cadenas de diferente longitud y grado de insaturación (Rivas, 1989 y Breithaup y Bamedi, 2002). Su fórmula es  $C_{40}H_{56}O$  (Rodríguez-Amaya, 2000). Contiene oxígeno como parte de las estructuras de anillos extremos (Figura 3). Cada uno de los grupos hidroxilo



altamente insaturados, degradándose principalmente por procesos de oxidación (Meléndez-Martínez y col., 2004). Los carotenoides son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante los lavados son mínimas. La congelación, la adición de antioxidantes y la exclusión de oxígeno disminuyen su degradación (Rodríguez-Amaya., 1999). Se ha comprobado que los factores que influyen en la degradación de carotenoides son varios; por ejemplo, exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes o antioxidantes, presencia de sulfitos, etc. (Rodríguez-Amaya., 1999).

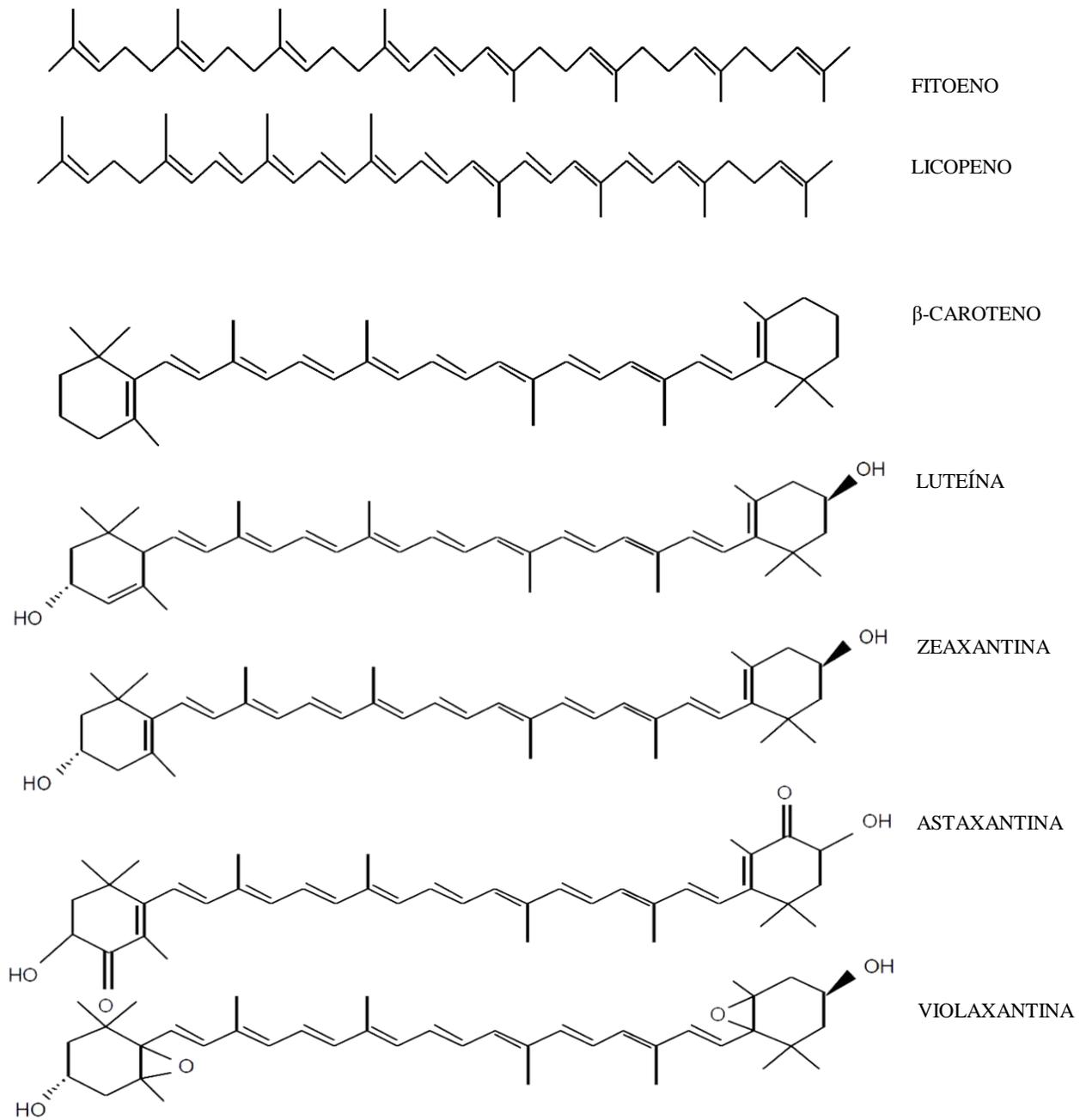
Hasta la fecha se han identificado más de 700 carotenoides, alrededor de 40 de ellos se encuentran en los alimentos tales como frutas y verduras. Menos de 20 carotenoides se han detectado en plasma y tejidos humanos (Bendich, 1993, Hornero-Méndez y Britton, 2002 y Feltl y col., 2005).

### **2.2.1 Estructura de los carotenoides**

Los carotenoides pertenecen al grupo de los terpenos, se originan de un precursor en común, una molécula de cinco carbonos llamada isopreno (Delgado-Vargas y col., 2000).

Una de sus características estructurales más importantes es que presentan de 3 a 15 dobles enlaces conjugados, que se producen por insaturaciones de la cadena hidrocarbonada (Figura 4). Estos enlaces son responsables de la capacidad de absorber luz de ciertas longitudes de onda y provocar la pigmentación de los tejidos que los contienen (Britton, 1995; Del Villar-Martínez y col., 2007).

De los carotenos más comunes se encuentran al licopeno, el  $\beta$ -caroteno; en el grupo de las xantófilas se tiene a la luteína, zeaxantina, violaxantina y astaxantina, entre otros (Figura 4) (Demmig-Adams y col., 1996).



**Figura 4.** Estructuras químicas de fitoeno, licopeno,  $\beta$ - caroteno, luteína, zaxantina, astaxantina y violaxantina (Del Villar y col., 2007 y Sandman, 2001).

Existe otro grupo de carotenoides bicíclicos, los que tienen un anillo  $\beta$  y un anillo  $\epsilon$  en su estructura. Estos anillos son comunes en plantas y animales y son precursores de varias xantofilas, la luteína es el ejemplo principal en muchas algas y plantas (Bartley y Scolnik, 1995; Cunningham y col., 1996; Pogson y col., 1996; Ronen y col., 1999).

### **2.2.2 Actividad biológica de los carotenoides**

La actividad biológica de los carotenoides deriva de su estructura molecular y varía según los distintos organismos animales o vegetales. En las plantas, los carotenoides participan en el proceso de fotosíntesis, absorben luz, cuando la clorofila está ausente en algunas raíces, hojas, flores y frutos, los carotenoides quedan expuestos y así protegen contra daño foto-oxidativo (Cuttris y Pogson, 2004; Pogson y col., 2006).

Por otro lado, es importante mencionar la característica provitaminica que se refiere a la capacidad que tienen algunos carotenoides para convertirse en retinol. La estructura química necesarias para dicha actividad implica la presencia en la molécula con un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido.

Diferentes carotenoides con y sin características de provitamina A presentan actividad antitumoral "*in vitro*" la cual podría ser mediada a través de regulación génica de proteínas para comunicación intercelular e inhibición de factores de crecimiento (Prabhala y col., 1993; Bertram y Bortkiewicz, 1995; Stahl y Sies, 1996; Levi y col., 1996). Por otro lado, la actividad como antioxidantes, moduladores de la respuesta inmune, moduladores de procesos inflamatorios y traducción de señales entre células que juegan un papel preventivo frente al cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular (Biesalski, 2001).

### **2.2.3 Importancia de los carotenoides en la prevención de enfermedades**

Los carotenoides juegan un papel importante en la prevención de enfermedades (Khachick y col., 2002). Se ha reportado que éstos, pueden ser responsables de los efectos benéficos en la prevención del cáncer en los seres humanos, lo cual está asociado con el consumo de vegetales (Mathews-Roth, 1991). Además de poseer actividad antioxidante, ciertos carotenoides presentan actividad biológica de provitamina A (Simpson, 1983), su potencial anticancerígeno aun es objeto de investigaciones.

Estudios epidemiológicos demuestran una relación directa entre la ingesta de xantófilas (luteína y zeaxantina) y la reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, especialmente el pulmonar (Chew y col., 1996; Van den Berg y col., 2000).

En trabajos realizados con ratones alimentados con una dieta adicionada de luteína, se observó una reducción del crecimiento de tumor mamario y se produjo una mayor proliferación de linfocitos (Chew y col., 1996; Hadden y col., 1999).

La luteína es también un potente antioxidante (Alves-Rodríguez y Shao, 2004), se le ha relacionado con la prevención del desarrollo de enfermedades oftálmicas asociadas con la edad, como son las cataratas y la degeneración macular (Mares-Perlman y col., 2002). Se ha encontrado que la luteína protege la piel contra los daños causados por la luz ultravioleta, evita el endurecimiento cardiovascular causado por el envejecimiento, las enfermedades coronarias y se usa para prevenir ciertos tipos de cáncer (Michaud y col., 2000).

En estudios recientes se ha reportado que por la ingesta de luteína se observa una tendencia a la disminución de la formación de tumor de pulmón (Hoyoku y col., 2009). La luteína también se encuentra entre los 10 fitoquímicos recomendados por

la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) como suplementos nutricionales generalmente considerados como seguros.

En la Tabla 1 se muestran diversos estudios realizados con algunos fitoquímicos bioactivos los cuales fueron obtenidos de diferentes fuentes, y probados en diferentes líneas celulares de cáncer, los resultados en todos los estudios, muestran tener un efecto citotóxico promoviendo la apoptosis.

### **2.3 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas mediante las cuales una parte de la planta, denominado explante se cultiva en condiciones asépticas en un medio de composición química definida, incubado bajo condiciones controladas (Mroginski y col., 2004). Toda célula vegetal es capaz de regenerar un nuevo individuo con características idénticas a las que dieron origen; a esta capacidad se le llama totipotencia (Litz y Jarrer, 1991). En algunos casos, las células pueden conformar una masa aparentemente desorganizada, conocida como callo, en otros casos, estarán presentes otras estructuras reconocibles como brotes o raíces. Estas respuestas dependerán del medio de cultivo que se utilice y la influencia de las fitohormonas adicionadas (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscisico y etileno) debido a que favorecen los procesos de crecimiento, división celular y formación de callo (Pérez-Molphe y col., 1999; Radice, 2004).

Una de las ventajas del CTV es que no se ve afectado por condiciones ambientales externas, como la estación del año, sequías, heladas, altas temperaturas, etc. (Mulabagal y Tsay 2004).

**Tabla 1.** Estudios del efecto de compuestos bioactivos en líneas celulares de cáncer.

<b>CAROTENOIDES</b>	<b>LINEA CELULAR DE CANCER</b>	<b>EFEECTO</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Fucoxantina y neoxantina</b>	Próstata	Promueve apoptosis	Kotake-Nara y col., 2001 Asai y col., 2004
<b>Licopeno</b>	Próstata	Promueve apoptosis	Agarwal y Rao, 1998; Hantz y col., 2005
<b>β-caroteno</b>	Leucemia y de colon	Promueve apoptosis	Palozza y col., 2001; Prasad y col., 2006
<b>Astaxantina</b>	Colon	Promueve apoptosis	Palozza y col., 2009

### **2.3.1 Proceso de desdiferenciación *in vitro***

Dentro del CTV, se puede observar el proceso de desdiferenciación, generando una masa amorfa de células de rápida proliferación a la cual se le denomina callo (Mulabagal y col., 2004). El cual tiene varias ventajas; su fácil mantenimiento en condiciones controladas y su rápida proliferación, lo que resulta un modelo apropiado para la producción de metabolitos secundarios (Arias y col., 2009).

Existen varios trabajos en los que se reporta la desdiferenciación de explantes de cempaxúchil mediante la formación de callo (García-Chavarría, 2007; Vanegas-Espinoza y col., 2011; Del Villar y col., 2011). Por otro lado, en las células de callos y lígulas de cempaxúchil se observan diferentes tipos de plastidios: proplastidios, cloroplastos y cromoplastos en donde se lleva a cabo la acumulación de carotenoides (Del Villar-Martínez y col., 2005, Ramos-Viveros, 2007). El estudio de estas alternativas ha permitido la obtención de diversos carotenoides, los cuales se han asociado con la prevención de varias enfermedades como el cáncer y su estudio en diversas líneas celulares de origen tumoral (Krinsky, 1993). Por lo que el callo de cempaxúchil, es una alternativa para la obtención de carotenoides y su estudio en líneas celulares de cáncer.

### **2.4 Cultivos celulares derivados de cáncer**

Entre los diversos modelos experimentales, el más utilizado ha sido el que emplea líneas celulares de cáncer humano, debido a que son homogéneos, se propagan fácilmente y proporcionan resultados reproducibles (Martínez, 2009).

El objetivo principal del cultivo de células humanas y animales es estandarizar e implementar procedimientos que permitan mantener y expandir una población de células de interés (Freshney, 2005). Una de las principales ventajas son el control del entorno fisicoquímico en que se mantienen (pH, temperatura, presión osmótica y la

tensión de CO<sub>2</sub>) que pueden ser controladas y mantenidas relativamente constantes (Rodríguez y col., 2006)

Los ensayos *in vitro* tienen el propósito de evaluar la actividad celular o molecular. Los de tipo celular emplean células intactas y en la molecular buscan la actividad dentro de un sistema aislado (Suffines y Pezzuto, 1991). Los ensayos se pueden dividir en citotóxicos o aquellos que presentan cambios morfológicos (Rahman y col. 2001). El uso de células cancerosas humanas ofrece un gran valor teórico y práctico.

#### **2.4.1 Cáncer cérvicouterino**

El cáncer cérvicouterino es una de las principales causas de muerte en las mujeres del mundo, en el año 2005, se registraron más de 500 000 casos nuevos. En el año 2007 se estima que hubo un número superior al millón de mujeres que padecía esta enfermedad. En ese año alrededor de 260 000 mujeres fallecieron a causa de ello (Organización Mundial de la Salud, 2007). En México cerca de 12,516 mujeres son diagnosticadas con cáncer cérvicouterino cada año y 5777 mueren (Organización Mundial de la Salud, 2010), debido a esto el cáncer cérvicouterino se convierte en una de las amenazas mas graves para la vida de la mujer.

Actualmente, existen diversos métodos utilizados para el tratamiento del cáncer, entre ellos la cirugía, radioterapia y la quimioterapia; además, se comercializan fármacos que se emplean en el tratamiento del cáncer, los cuales actúan bajo distintos mecanismos para evitar que las células cancerosas se dupliquen (Weiss., 1997; Lazcano y col., 2000 y De Vita y col., 2001). Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de la medicina, se ha recurrido a terapias conocidas como alternativas con productos principalmente de uso tradicional (Dowdy, 2002). Trabajos realizados con antitumorales de origen natural, han demostrado que actúan sobre células con alta tasa de división mediante la inhibición del crecimiento y la proliferación, como por ejemplo, los extractos acuosos de *Calendula* presentan

inhibición en la proliferación tumoral (Jiménez-Medina y col. 2006, Ukiya y col., 2006). Los extractos de *Tagetes lucida* presentaron efecto citotóxico en la línea de cáncer cérvicouterino (HeLa) (Vega-Avila y col., 2009).

#### **2.4.2 Línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa)**

Las células HeLa son la primera línea celular humana de tejido extraída del tumor de cáncer cérvicouterino, donada por Henrietta Lacks fallecida por esta causa en 1951. Estas células poseen la característica de dividirse de forma indefinida lo que no ocurre con otras células y por esto han sido ampliamente usadas en investigación sobre cáncer (Dosne, 2006).

#### **2.5 Mecanismos que inhiben o retardan el crecimiento celular**

El propósito de determinar el potencial citotóxico de compuestos, es para ser usados como fármacos o porque van a ser usados como agentes anticáncer (Freshney, 2005). La determinación de la proliferación celular y la citotoxicidad *in vitro*, es la primera aproximación para determinar los efectos de una droga sobre un tipo celular.

Por otra parte, la apoptosis o muerte celular programada es un parámetro que determina el estado del cultivo, porque revela condiciones específicas de la célula a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético que no pueden ser reconocidas de manera completa y clara por otros parámetros celulares (Vicencio y col., 2008). De especial atención es la fase de iniciación, ya que es objeto de una regulación muy compleja y puede ser iniciada por una amplia variedad de estímulos, pues no todas las células desencadenan apoptosis en respuesta al mismo estímulo (Hernández y col., 2006).

### **2.5.1 Muerte celular**

La muerte celular se ha dividido en dos grandes grupos; necrosis y muerte celular programada o apoptosis (Kanduc y col., 2002; Zhang y col., 2004).

La necrosis puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo. Dentro de los factores que lo producen están; la isquemia, la hipotermia severa, trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos. Las células presentan características como; aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células en la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis (Wyllie y col., 1980).

Por otra parte la apoptosis, se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos. Es un proceso activo que se mantiene a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular (homeostasis) y que forma parte de los procesos fisiológicos necesarios para el funcionamiento normal de un organismo (Sánchez-Torres y col., 2003). La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer, cuando la proliferación se encuentra aumentada, o bien, conduce a enfermedades degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados (Evan y Vousden 2001; Danial y Korsmeyer 2004).

En la apoptosis, las células programan su autodestrucción sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos (Jordán, 2003).

Los factores característicos en procesos apoptóticos, son:

1. Aumento en la densidad intracelular.
2. Pérdida de adhesión celular, las células se retraen y pierden el contacto con células vecinas.

3. Incremento moderado de la concentración citoplasmática de calcio libre.
4. Cambios en la composición de la membrana celular, se observa translocación de fosfolípidos como la fosfatidil serina, desde la cara interna de la membrana a la superficie celular. Estos cambios van actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de los fagocitos que procesan a los cuerpos apoptóticos resultantes y de esta manera, se evita la liberación del contenido celular y la posible reacción inflamatoria.
5. Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto.
6. Activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas de señalización de los procesos de muerte celular.
7. La membrana plasmática comienza a presentar circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. Como resultado de las grandes invaginaciones aparecen los cuerpos apoptóticos (Kanduc, y col., 2002; Jordán, 2003).

## **2.6 Tratamiento digital de imágenes como herramienta para caracterizar procesos.**

El tratamiento digital de imágenes (TDI) es una técnica que no es destructiva y permite cuantificar cambios morfológicos. Uno de los objetivos principales del tratamiento de imágenes es la medición de varios parámetros (Caldas y Hurtado, 2006).

La literatura especializada distingue dos áreas principales de aplicación. El procesamiento de imágenes con la finalidad de mejorar la información de modo que sea comprensible por observadores humanos, y el procesamiento y análisis de imágenes, con la finalidad de hacer que sean reconocidas automáticamente por software especializado (Monedero, 1999).

El tratamiento de imágenes se interpreta como el conjunto de técnicas y métodos que llevan a una fácil extracción de la información cuantitativa que contiene una imagen, con el objetivo de interpretarlos mediante un análisis de las imágenes procesadas, esto se realiza con un sistema informático capaz de extraer de forma rápida toda la información relevante contenida en una imagen determinada. El tratamiento digital de imágenes está siendo utilizado como una herramienta útil para la investigación en diversos campos de estudio como la medicina, meteorología, ecología, física y biotecnología entre otras, debido que es una técnica no destructiva y que puede dar información sobre la textura y morfología de los objetos. El procesamiento de imágenes involucra diversos pasos, como la adquisición de la imagen digital, el procesamiento de la imagen, la segmentación, la medición y el reconocimiento e interpretación. En la imagen capturada, se le llama objeto a los elementos que son distinguibles e independientes entre si y que destacan del fondo que los rodea, durante el procesamiento de la imagen, se extraen los objetos, los cuales contienen la información de interés. Para obtener las características dimensionales que permiten obtener datos de área, perímetro, volumen o parámetros de forma (Ibaraki y Kenji, 2001; Pertusa-Grau, 2004).

En 1994 Tucker y col., presentaron un sistema automatizado de análisis de imágenes para cuantificar la viabilidad y la concentración de células con base en el método de exclusión con azul de tripano. Por otro lado, se ha reportado el análisis del ensayo de anexina-V para determinar viabilidad celular y la muerte de estas por necrosis y apoptosis (Pläsier y col., 1999).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Existen reportes epidemiológicos de una relación entre la ingesta de xantófilas (luteína y zeaxantina) y la disminución del riesgo a padecer ciertos tipos de cáncer. En los últimos años han surgido evidencias de que ciertos carotenoides probados en líneas celulares de cáncer muestran tener un efecto citotóxico promoviendo la apoptosis. Sin embargo, a la fecha no existe evidencia del efecto de los extractos de lígulas y callos de cempaxúchil sobre la línea celular HeLa. Por lo tanto sería importante conocer el efecto citotóxico de los extractos de cempaxúchil sobre células tumorales.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los extractos de lígula y callo de cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.) contienen carotenoides con una probable acción citotóxica provocando la modificación de la proliferación celular o bien la inducción de muerte programada sobre células derivadas de cáncer cérvicouterino.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

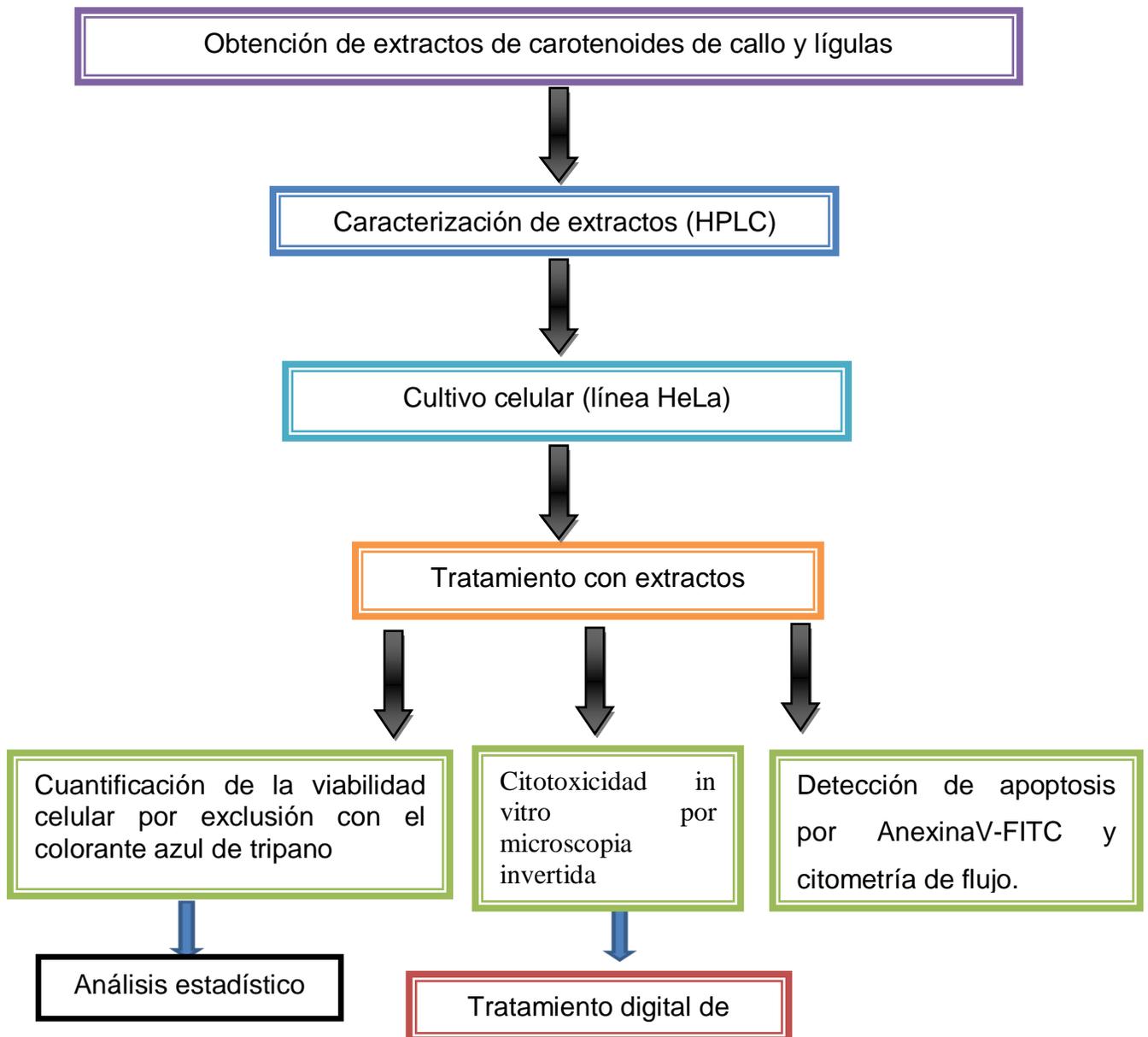
Evaluar el probable efecto citotóxico de los extractos de lígula y callo de cempaxúchil sobre la inducción de muerte programada de la línea celular HeLa.

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los extractos de carotenoides obtenidos a partir de lígulas y callo de cempaxúchil.
- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de extractos de cempaxúchil en la línea tumoral HeLa, mediante microscopía, exclusión de azul de tripáno y cuentas viables.
- Evaluar *in vitro* el tipo de muerte celular inducida por los extractos de cempaxúchil en la línea tumoral HeLa, mediante tinción de anexinaV-FITC

## VI. DIAGRAMA GENERAL

A continuación se muestra la estrategia experimental para alcanzar los objetivos de este trabajo (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama general de la estrategia experimental.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico

Los extractos se obtuvieron de lígulas liofilizadas de cempaxúchil (*T. erecta*) colectadas en el municipio de Yautepec, Morelos.

Las células desdiferenciadas (callo) se obtuvieron a partir de explantes de hojas jóvenes de cempaxúchil, en medio MS semi-sólido adicionando 2 mg/L de 2,4-D (Acido 2,4-diclorofenoxiacético) y 2 mg/L de BA (Benciladenina) (García-Chavarría, 2007), mantenidas en oscuridad. Los callos se liofilizaron y pulverizaron.

En este estudio se utilizó la línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa).

### 7.2 Obtención de extractos de carotenoides a partir de lígulas y callo de *Tagetes erecta*

Se realizó la extracción de pigmentos de lígulas y callos de cempaxúchil utilizando el método de Heinonen, (1989) modificado. Se pesaron 200 mg de lígula y 400 mg callo de tejido seco, se adicionaron 3 y 6 ml de acetona al 100% respectivamente en tubos de 15 ml. El tubo se cubrió con papel aluminio incubándolo por 16 h en agitación a 100 rpm. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 ml. La mezcla que se obtuvo se filtró y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante. El volumen recuperado se concentró a sequedad bajo una atmósfera de nitrógeno y las muestras se almacenaron a -70° C hasta el momento de ser utilizadas.

Para el análisis de carotenoides por HPLC; los extractos se saponificaron de la siguiente manera: se adicionó KOH al 40% vol. 1:1 por 2 h en agitación. La solución se lavó con H<sub>2</sub>O destilada vol. 1:1 y 2 ml aproximadamente de NaCl 5%, posteriormente se hicieron 3 lavados con agua miliQ hasta eliminar por completo el

KOH, la muestra se concentró a sequedad bajo una atmosfera de nitrógeno y se resuspendió en 40 µl de acetato de etilo.

### **7.3 Identificación de pigmentos por espectrofotometría**

Para la identificación de carotenos y xantófilas totales se determinó la absorbancia en cada una de las muestras resuspendidas en acetona (lígula y callo) en espectrofotómetro (UV-Vis Lobomed Modelo UVD-3500), se utilizó acetona como blanco y la lectura se realizó a una longitud de onda de 436 y 474 nm (Larcher, 1995). Se realizó un barrido en el espectro de 300 a 700 nm.

### **7.4 Obtención del estándar de luteína a partir de lígulas de cempaxúchil**

Para la identificación de carotenoides en lígulas y callos de cempaxúchil, se obtuvieron estándares de referencia de luteína obtenida de lígula de cempaxúchil y también se utilizó como estándar de referencia a la zeaxantina comercial (sigma-Aldrich, Alemania).

El aislamiento de la luteína se realizó mediante cromatografía en columna. La columna de vidrio (70x2 cm) se preparó de la siguiente manera: se colocó una porción de algodón en la base del tubo, lavándose con éter de petróleo (EP) (40-60° C) para eliminar las impurezas, posteriormente, se colocó la fase estacionaria (óxido de magnesio: Hyflo Super Cel. (1:1) suspendida en EP, se abrió la llave de la columna hasta que quedara una capa de líquido de 0.5 cm por encima de la fase estacionaria. Se disolvieron 6 mg extracto de lígulas en un volumen mínimo de EP (40-60° C) y se vació en la columna. A continuación, las paredes internas de la columna se lavaron con EP (40-60° C) finalmente se agregó la fase móvil, usando acetona al 18% en EP y se obtuvo luteína, para posteriormente evaporarlo y concentrarlo a sequedad (Kimura y col., 2002). Con la que se construyó una curva de calibración; con las concentraciones siguientes: 0.053, 0.16, 0.58, 0.74 y 0.95 µg/ml.

## **7.5 Análisis de carotenoides de cempaxúchil por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Para el análisis de los pigmentos, se inyectaron 20  $\mu$ L de la muestra resuspendida en acetato de etilo de lígulas y callos de cempaxúchil. Los pigmentos se identificaron con base en sus características de absorción y tiempo de retención comparándose con estándares de referencia en un equipo de HPLC (Agilent 1100 Palo Alto, California, EE.UU.). Se utilizó una columna YMC C<sub>30</sub> fase reversa (5  $\mu$ m, 250x 4.6mm), (YMC, Wilmington, NC, USA). Se utilizó un gradiente de metanol (MeOH) (Merck), metil-t-butil éter (TBME) (Merck) y agua. El gradiente de elución fue el descrito por Mouly y col., (1999), Meléndez-Martínez y col., (2005): 0 min: 90% MeOH + 5% TBME + 5% agua; 12 min: 95% MeOH + 5% TBME; 25 min: 89% MeOH + 11% TBME; 40 min: 75% MeOH + 25% TBME; 50 min: 40% MeOH + 60% TBME; 56 min: 15% MeOH + 85% TBME; 62 min: 90% MeOH + 5% TBME 5% agua: MeOH.

La identificación se realizó en base a la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ), tiempo de retención y por comparación con el estándar de luteína purificado y el estándar comercial de zeaxantina (Sigma- Aldrich, Alemania). Para la cuantificación de la luteína, se realizó una curva de calibración con la luteína purificada.

## **7.6 Cultivo de la línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa)**

En este estudio se utilizó la línea celular HeLa, células derivadas de cáncer cérvicouterino amablemente donada al Laboratorio de Microbiología, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, por los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas LEI, a través de la Jefa de Investigación, Dra. Laura Padierna Mota.

Esta línea se cultivó en monocapa confluyente, se mantuvo y propagó en medio de cultivo celular DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L-Glutamina, 25mM de ácido N-2-

hidroxietilpiperazina -N-2- etanosulfónico (HEPES), 100 µl/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina; mantenidas en cámara húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. El manejo de la línea celular se realizó bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de bioseguridad de tipo II (Domínguez, 2008).

## **7.7 Método para la cuantificación de la viabilidad celular**

Se utilizó el método de exclusión con el colorante azul de tripano. El azul de tripano es un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). Esto ocurre debido a que el azul de tripano es una amina orgánica, con carga neta negativa que no penetra al interior de las células que presentan sus membranas integra, mientras que las células dañadas rápidamente lo incorporan al citoplasma, es probable que la exclusión de la amina sea un proceso de membrana dependiente de energía (Freshney, 2005). Se utilizó este método de conteo para determinar el número de células viables tras los tratamientos con extractos de cempaxúchil (lígula y callo) en la línea celular HeLa.

El método de cuentas viables con azul de tripano permite establecer el número de células vivas y muertas que se encuentran en una muestra determinada. En el caso de los efectos citotóxicos, éste método permite estimar indirectamente si las células están proliferando cuando se han sometido a tratamientos con sustancias químicas o biológicas. Esto se logra al comparar los resultado de las cuentas viables de los problemas y comparándolos con controles experimentales positivo y negativo. El control positivo normalmente es un inhibidor de la proliferación (Taxol), o inductor de muerte (Actinomicina D) y el control negativo son las células sin tratamiento incubándolas con suero fetal bovino, para estimar lo que las células hubieran proliferado en ausencia de los tratamientos con las sustancias químicas en cuestión (Freshney, 2005).

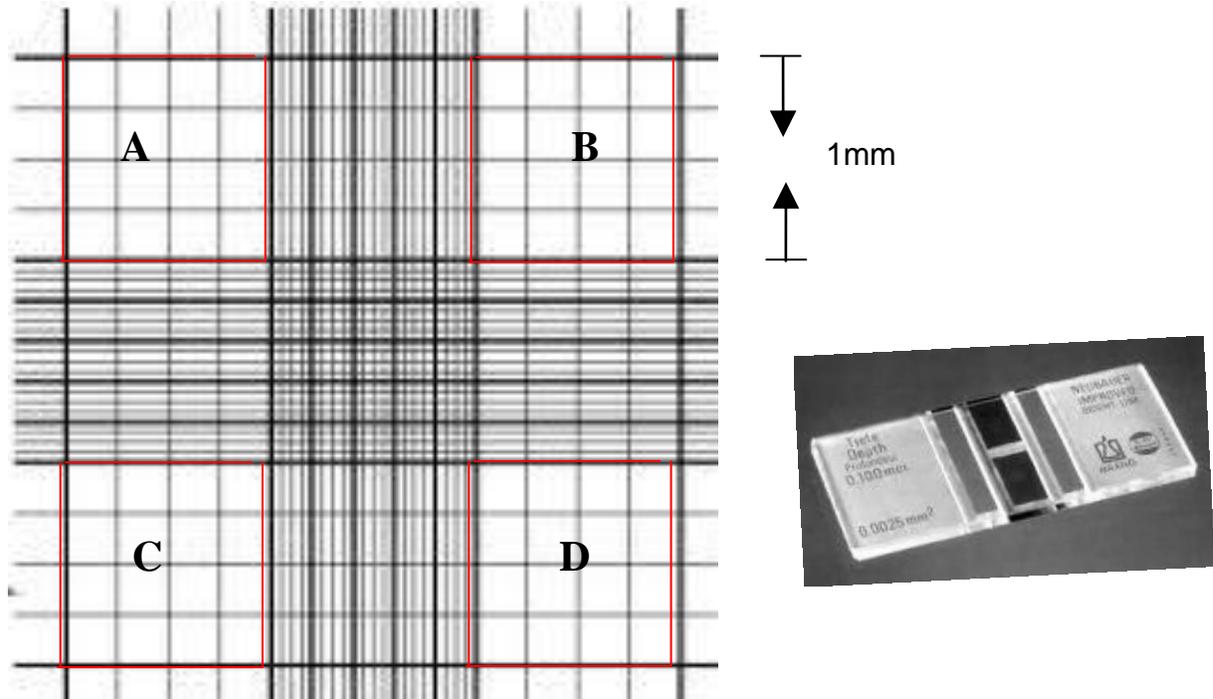
Como control negativo se utilizaron las células sin tratamiento, como control positivo se utilizaron taxol 1 µg/ml y actinomicina (2 µg/ml). Las células Hela que crecen en

monocapa se cultivaron hasta obtener confluencia del 70-80%, posteriormente se tripsinizaron para poder hacer el conteo y observar la viabilidad celular por medio de tinción con azul de tripano. Se colocaron 10,000 células por pozo en una placa de 6 pozos. La placa se incubó a 37° C a una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, se agregaron las distintas concentraciones del extracto de lígula (25 µg/ml y 6.25 µg/ml) y callo (25 µg/ml y 12.5 µg/ml) de cempaxúchil y se incubó por 24 h. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con 150 µl de PBS 1x, en cada pozo, se decantó el PBS, y posteriormente se agregaron 50 µL de tripsina con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco). Finalmente se colectaron las células desprendidas con tripsina y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer; para ello se colocó el cubre-hematímetro sobre la cámara de Neubauer y se depositaron 20 µl de la mezcla de células y 20 µl del colorante azul de tripano (relación 1:1) verificando que por capilaridad las células se distribuyan aleatoriamente.

Posteriormente se realizó el conteo de las en los compartimientos de la cámara, los recuadros A, B, C y D de la figura 6, ilustran las áreas de conteo. Solamente son contadas las células que se encuentran dentro de cada cuadrante.

### **7.8 Análisis estadístico de la viabilidad de células HeLa**

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete de diseños experimentales Statgraphics plus versión 4.1. El análisis de comparaciones múltiples se realizó mediante Tukey. Para analizar las diferencias entre la viabilidad de las células tratadas.



**Figura 6.** Amplificación del cuadrante de una cámara de Neubauer (Los cuadrantes para la lectura están marcados como A, B, C y D).

### **7.9. Tinción con anexina V-FITC/ yoduro de propidio para la detección de apoptosis**

Diversas técnicas permiten analizar diferentes aspectos del proceso de apoptosis (Huerta y col., 2007). En las células la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina y la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una translocación de los residuos de fosfatidilserina de membrana interna a membrana externa, exponiendo de esta manera los residuos de la fosfatidilserina al exterior (Rodríguez-Diez y Orea, 2004 y Reed, 2000).

La Anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos y es dependiente de calcio, y tiene una gran afinidad de unión a los residuos de fosfatidilserina. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales (Rodríguez-Diez y Orea, 2004)

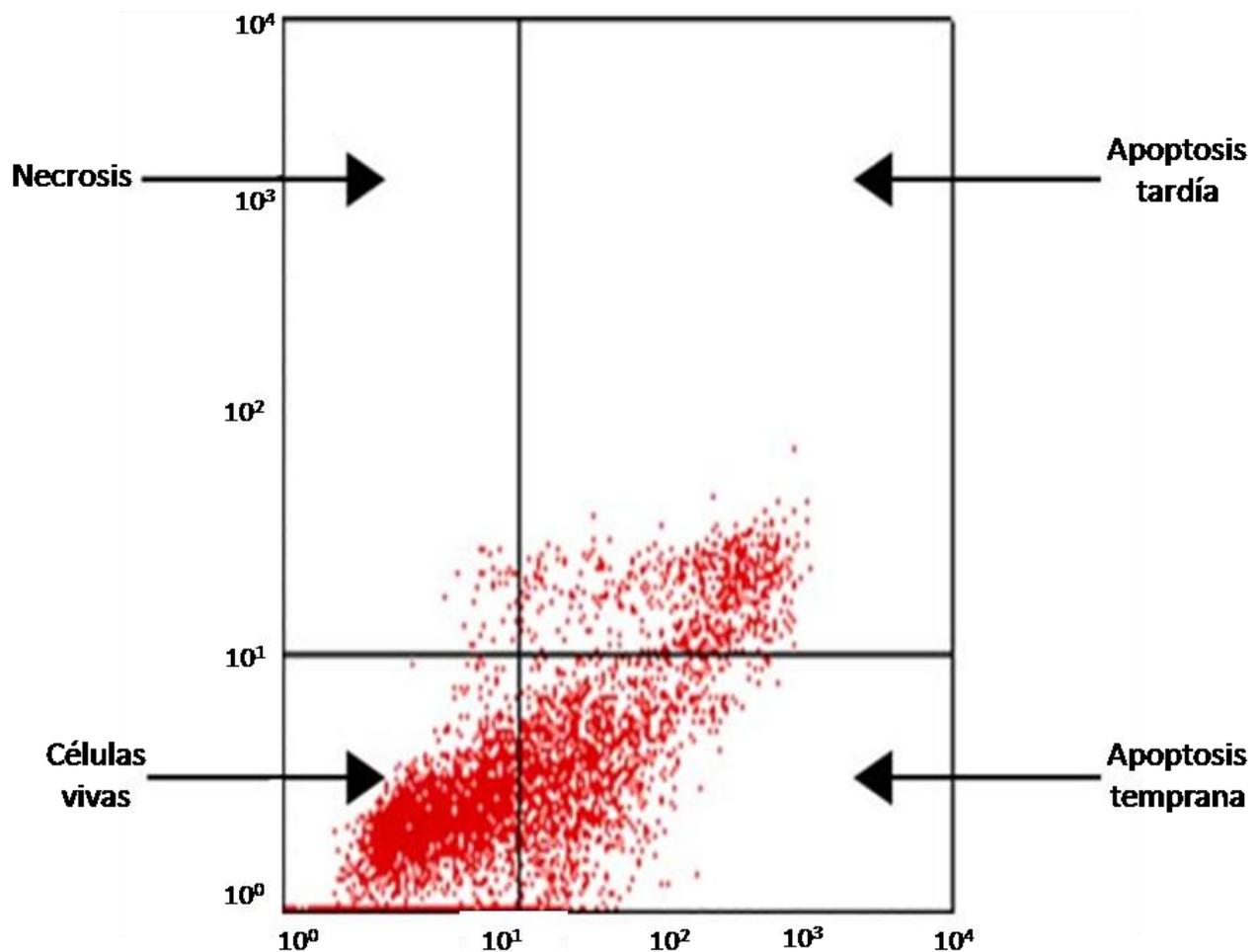
Para la detección de la apoptosis se utilizó el kit (BioVision) con la tinción de anexina V-FITC, en el cual la anexina-V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Assay protocol).

Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza, permiten la entrada de yoduro de propidio. Si las células necróticas unen también la AnexinaV, es que sufrieron apoptosis y luego necrosis. El citómetro distingue estas células con doble tinción y las tinciones simples, la de AnexinaV-FITC, que marca las células con apoptosis temprana y las que solo toman el yoduro de propidio. Solo las células con la membrana permeabilizada podrán unir este último fluorocromo.

La detección se realizó de la siguiente manera, la línea celular se sembró en placas de 6 pozos. Los tratamientos de extractos de cempaxúchil se incubaron con las células por 24 h. Se transfirió el medio de cultivo de las células adherentes a un tubo cónico de 15 ml y se colocó en hielo. Se lavaron las células de cultivo cuidadosamente con PBS 1X. Se retiró el sobrenadante agregándolo al tubo falcon de 15 ml. Posteriormente se añadió 2 ml de tripsina y se incubó hasta que las células se despegaron. Se agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de suero fetal bovino (SFB). Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Después se colocó el volumen de los pozos en un tubo para citometría de flujo (Falcon de 5ml policarbonato con tapa) se centrifugó a 2000 rpm por 2 min a 4°C, el pellet celular se resuspendió en 500 µL de medio fresco sin suero. Se adicionaron 0.5 ml del buffer de unión y 1 µL del reactivo de anexina V-FITC y 5 µL de yoduro de propidio, se incubó por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton y Dickinson) en donde se

analizaron 10,000 eventos por experimento y a partir de las lecturas, el citómetro construye citogramas que se usan para interpretar los resultados.

La señal del FITC (fluorescencia en color verde) se detectó a 518 nm, el logaritmo de esta fluorescencia se representó en el eje de las X. La señal del yoduro de propidio se detectó a 620 nm y el logaritmo de esta se representó en el eje de las Y. En el cuadrante inferior izquierdo aparecen las células viables, en el inferior derecho aparecen las células en apoptosis temprana, en el superior derecho apoptosis tardía y en el superior izquierdo necrosis (Figura 7).



**Figura 7.** Representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC.

## 7.10 Tratamiento digital de imágenes

Se capturaron 150 imágenes digitales por tratamiento, utilizando el Microscopio invertido (Nikon eclipse T5100, modelo CSHG, Japón) acoplado a una cámara digital (Nikon digital sight) con un software Nis- Element photos Nikon. La captura se realizó manteniendo una distancia focal constante con una resolución de 1600 x 1200 pixeles (23091 ppc) y se almacenaron en RGB, formato TIF (Tagged-Image File Format).

Para llevar a cabo el tratamiento digital de las imágenes, éstas se procesaron utilizando el programa ImageJ, cada una de las imágenes se transformó a escala de grises (8 bits) y posteriormente las células se segmentaron usando el método manual, el cual consistió en seleccionar el objeto de interés desde la imagen original con la tableta bamboo (CTE-450). Lo cual permitió posteriormente evaluar los cambios morfológicos de las células HeLa en los diferentes tratamientos con el extracto de lígulas y callo de cempaxúchil, los parámetros evaluados fueron: área: que indica el espacio que ocupa un objeto. Perímetro: se refiere a la longitud del contorno del objeto. Circularidad y diámetro de Feret: corresponde al diámetro teórico de mayor longitud.

Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía.

### **XIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **8.1 Obtención de extractos de lígula y callo de cempaxúchil y caracterización espectrofotométrica**

En la figura 8 se presenta el espectro de absorción de los extractos de lígula de cempaxúchil. Se identificaron tres picos, uno de ellos a los 446 nm que corresponde a la luteína, de acuerdo con lo reportado por Delgado Vargas y Paredes López, 1996 quienes reportan que la luteína presenta un pico de máxima absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) alrededor de los 447 nm; adicionalmente, se ha reportado que la luteína representa aproximadamente el 90% del total de carotenoides en cempaxúchil (Leigh y col., 1999; Del Villar-Martínez y col., 2011).

Los dos picos adyacentes que se observan en el espectro de absorción corresponden a los isómeros de luteína denominados 13-cis-luteína y 9,9-cis-luteína (Delgado Vargas y Paredes López, 1996). Tsao y col., (2004) reportaron que los isómeros de luteína son compuestos que presentan una  $\lambda_{\text{máx}}= 418$  y 468 nm respectivamente.

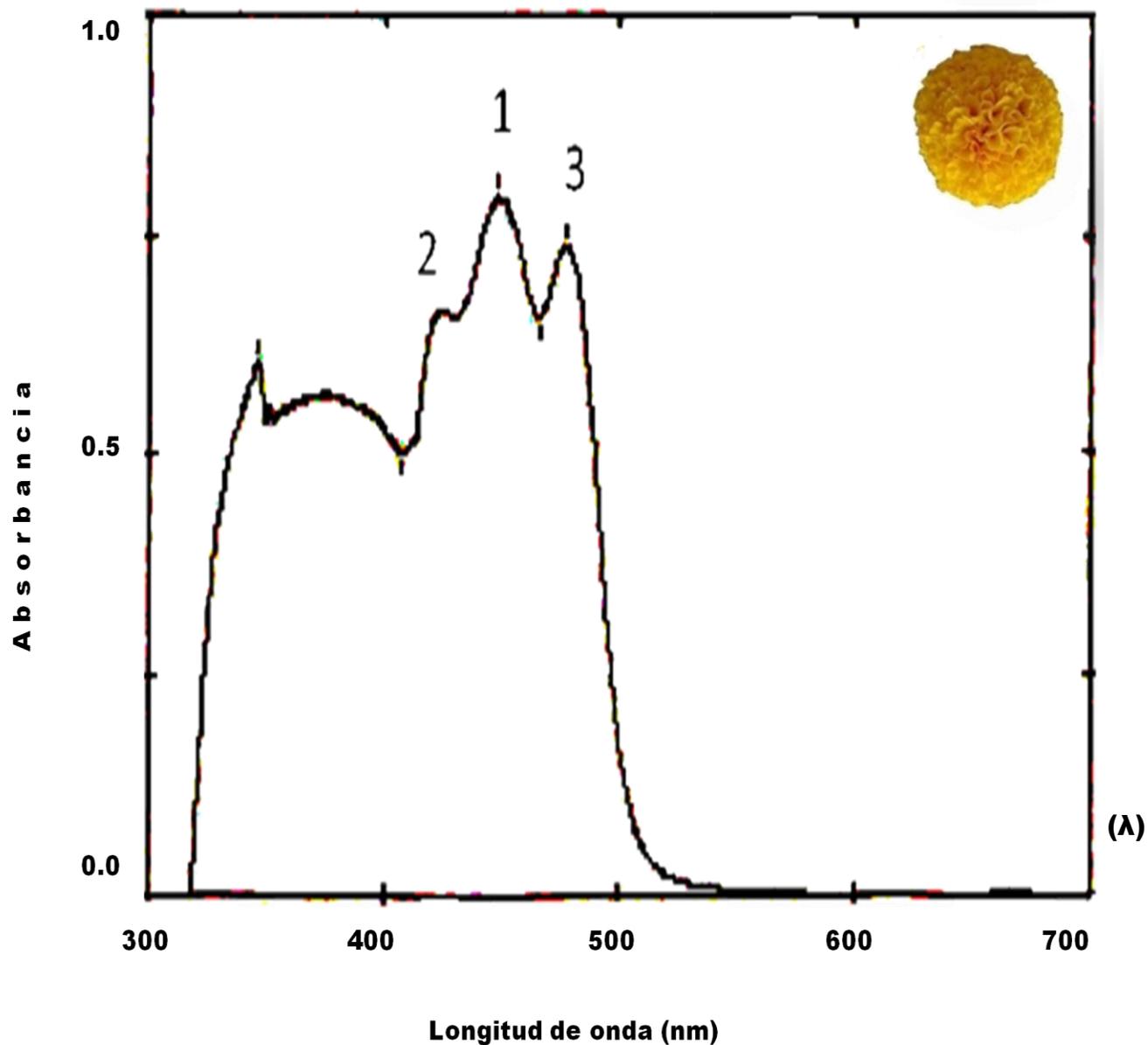
Por otro lado, en el extracto de callo (Figura 9), se identificaron a la luteína a los 446 nm y los dos isómeros de luteína 13-cis-luteína (418 nm) y 9,9-cis-luteína (468 nm) lo cual coincide con lo reportado por Delgado Vargas y Paredes López (1996).

#### **8.2 Análisis del extracto de lígula y callo de cempaxúchil mediante HPLC**

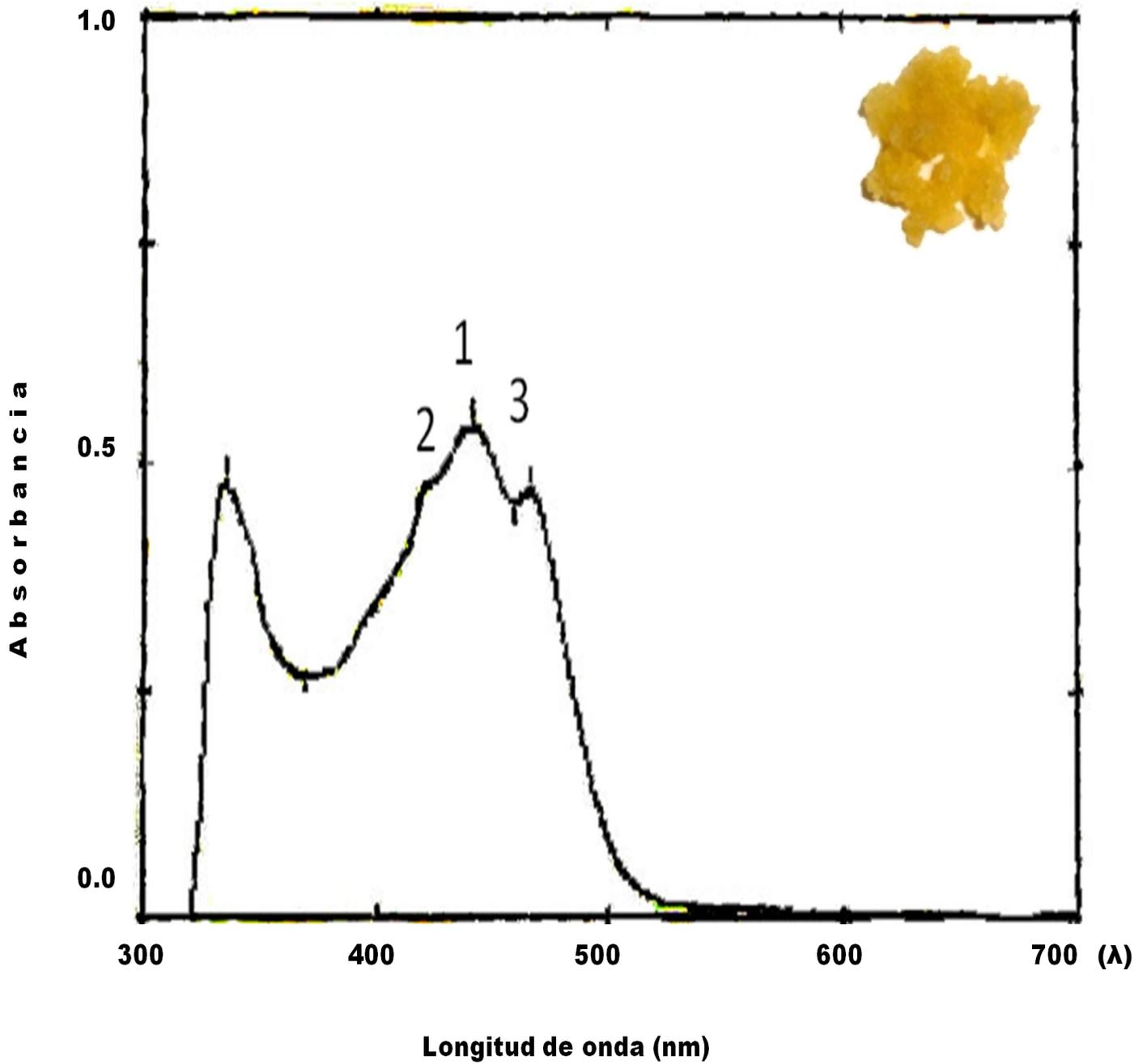
El estándar de luteína presentó un tiempo de retención de 23.7 min con el método empleado, bajo nuestras condiciones de trabajo. El perfil cromatográfico a 445 nm corresponde a luteína, tal como lo reporta Britton y col., (2004).

Es importante mencionar que este estándar se purificó de las lígulas de cempaxúchil. El estándar de zeaxantina (Sigma-Aldrich, Alemania) presentó un tiempo de retención de

27.08 min. Estos resultados sirvieron de referencia para identificar los compuestos presentes en las muestras.

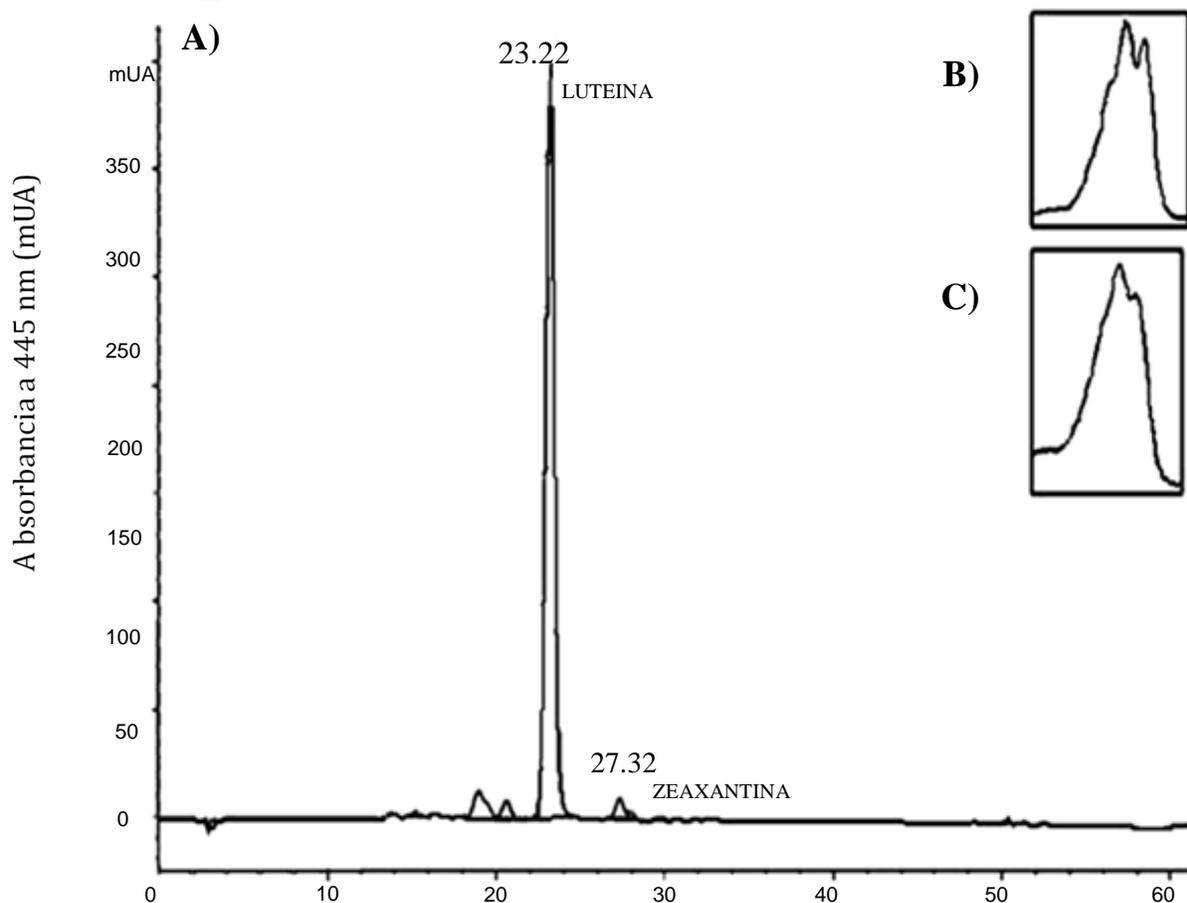


**Figura 8.** Perfil espectrofotométrico de los extractos de lígula de cempaxúchil, diluido en acetona 1:100. 1) trans-luteína, 2) 13-cis-luteína y 3) 9,9-cis-luteína.

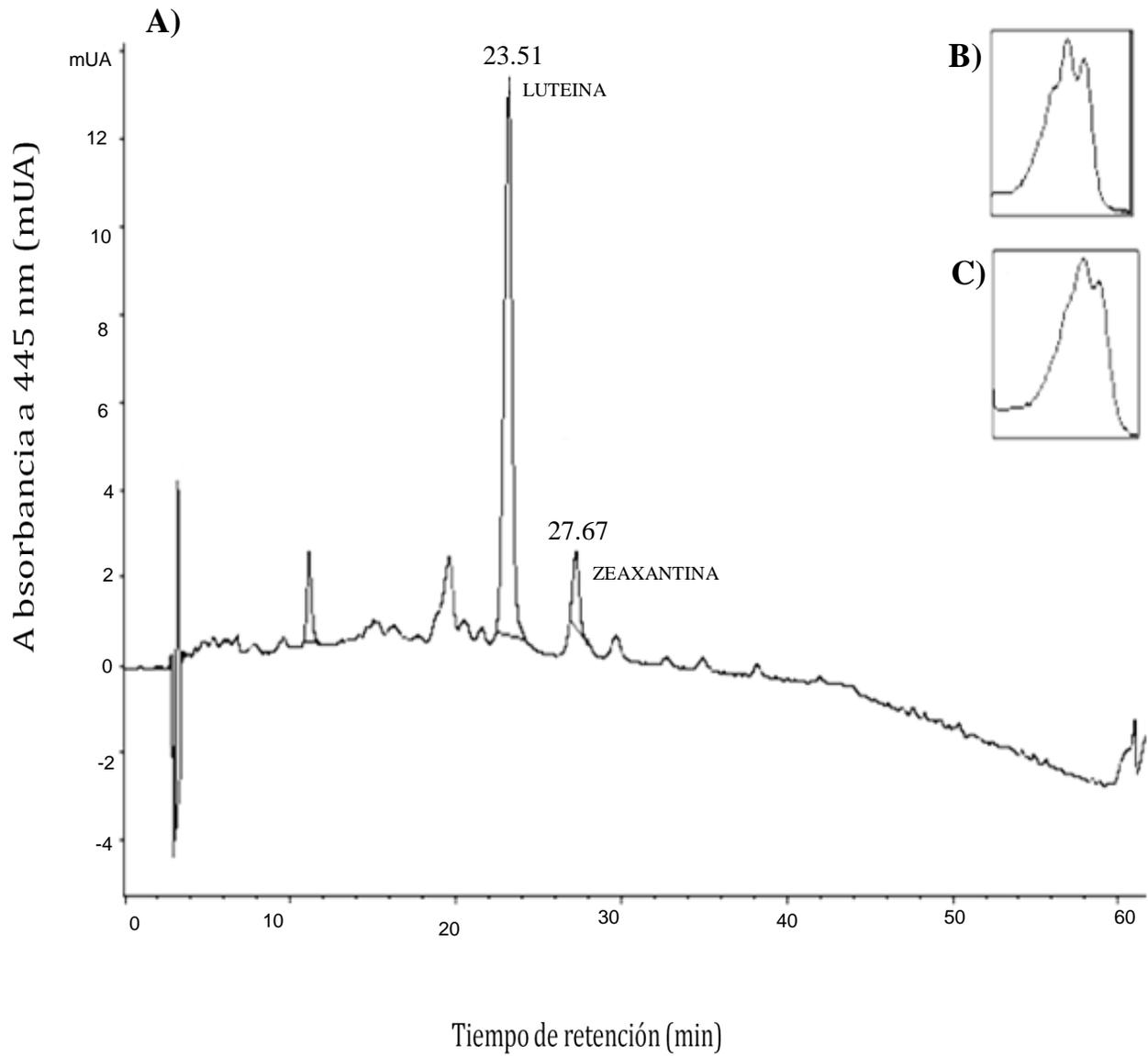


**Figura 9.** Espectro de absorción de los extractos de callo de cempaxúchil diluido en acetona 1:10. 1) trans-luteína, 2) 13-cis-luteína y 3) 9,9-cis-luteína.

En la figura 10 se muestra el perfil cromatográfico correspondiente al extracto de lígulas de cempaxúchil. Se detectó un pico a los 23.22 min, que corresponde a la luteína, así como la zeaxantina a los 27.32 min. En el callo (Figura 11) también se presentaron picos a los 23.51 min correspondiente a luteína y 27.67 min que correspondió a zeaxantina (Scott y Eldridge, 2004; Navarrete-Bolaños y col., 2005).



**Figura 10.** Perfil cromatográfico de extractos de lígula de cempaxúchil. A) Luteína (tiempo de retención = 23.22 min) y zeaxantina (tiempo de retención = 27.32 min) y sus respectivos espectros de absorción, B) luteína y C) zeaxantina.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico de extractos de callo de cempaxúchil. A) Luteína (tiempo de retención = 23.51 min) y zeaxantina (tiempo de retención = 27.67 min) y sus respectivos espectros de absorción, B) luteína y C) zeaxantina.

Para calcular la concentración de luteína en las muestras se construyó una curva de calibración (Figura 12), con el pigmento purificado de cempaxúchil con ayuda de la ecuación:

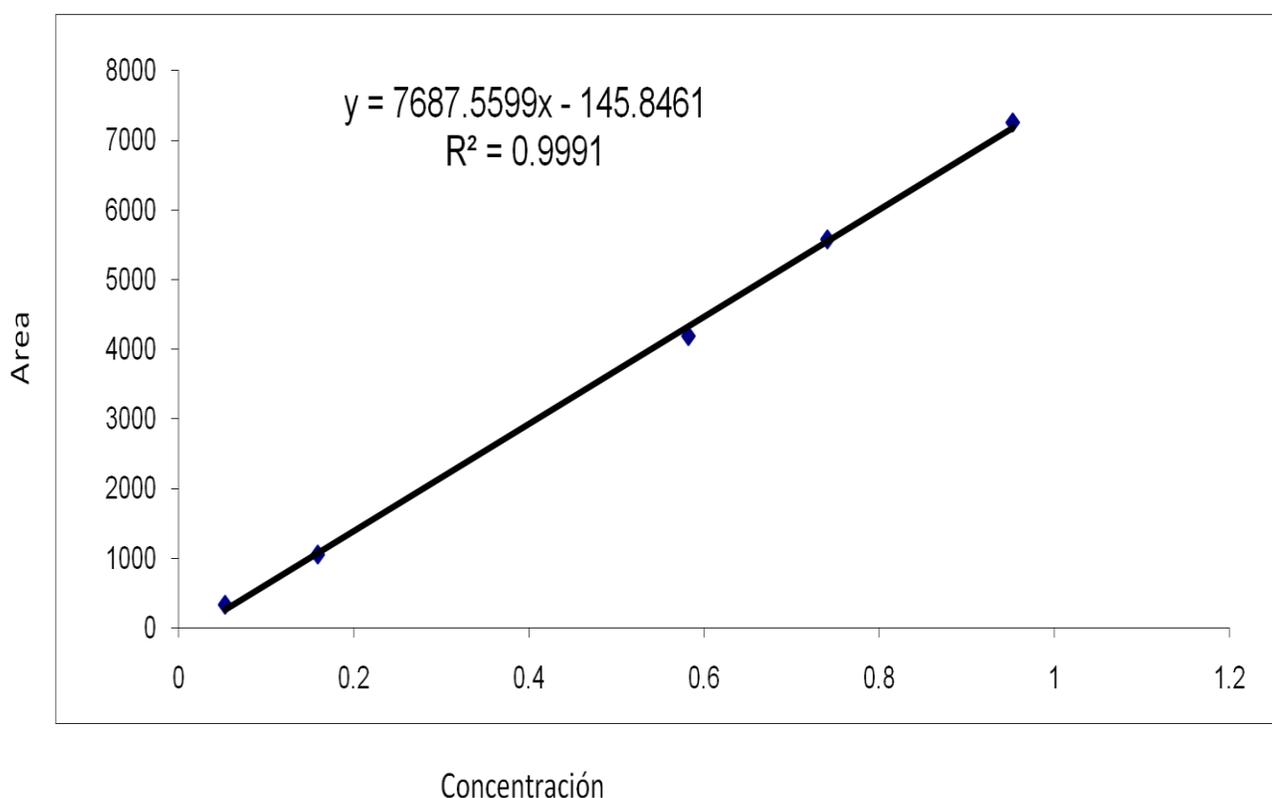
$$y = 7687.5599x - 145.8461$$
$$R^2 = 0.9991$$

Donde:

y= Área

x= Concentración

R<sup>2</sup>= Coeficiente de correlación



**Figura 12.** Curva de calibración para calcular la concentración de luteína en las muestras analizadas

En la Tabla 2 se presentan los datos correspondientes a la concentración de luteína que se determinó en las lígulas y callo de cempaxúchil. La lígula mostró un contenido de  $3.3 \times 10^3 \mu\text{g/g}$  en peso seco, es decir, 792 veces más con respecto al callo que presentó  $4.124 \mu\text{g/g}$  en peso seco. La concentración de lígula corresponde

a lo reportado por Del Villar-Martínez y col., (2005) en donde mostraron niveles de luteína que oscilaron entre los  $0.4 \times 10^3$  y  $6 \times 10^3$   $\mu\text{g/g}$  en lígulas de cempaxúchil.

Sánchez (2008) reportó concentraciones de luteína en cempaxúchil que oscilan entre los  $2.8 \times 10^3$  y  $6.1 \times 10^3$   $\mu\text{g/g}$  en peso fresco. Ramos (2009) mostró una concentración de luteína en callo de 0.17  $\mu\text{g/g}$  en peso fresco, lo que indica mejor extracción de luteína en peso seco.

**Tabla 2.** Contenido de luteína en extractos de lígula y callo de cempaxúchil determinado por HPLC.

	<b>Muestras</b> <i>Tagetes erecta</i>	<b>Concentración de luteína</b> ( $\mu\text{g/g}$ de peso seco)
	Callo	<b>4.124</b>
	Lígula	<b><math>3.3 \times 10^3</math></b>

El callo presentó una menor concentración de pigmento (4.124  $\mu\text{g/g}$  en peso seco) En comparación con la lígula ( $3.3 \times 10^3$   $\mu\text{g/g}$ ), esto puede interpretarse debido a la naturaleza de los tejidos y se puede predecir desde el momento en que se observan las muestra. Las lígulas son tejido, muy especializado en plantas, en donde se lleva a cabo la acumulación de los pigmentos; mientras que, el callo es un agregado de células desdiferenciadas que se componen principalmente de agua, sin embargo, acumula luteína y en menor proporción zeaxantina. El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica útil, para la producción de metabolitos secundarios

de interés alimentario y farmacéutico (Martínez, 2003). Los pigmentos de las dos fuentes se utilizaron para llevar a cabo los experimentos para evaluar el efecto de los extractos sobre células de cáncer cérvicouterino (HeLa).

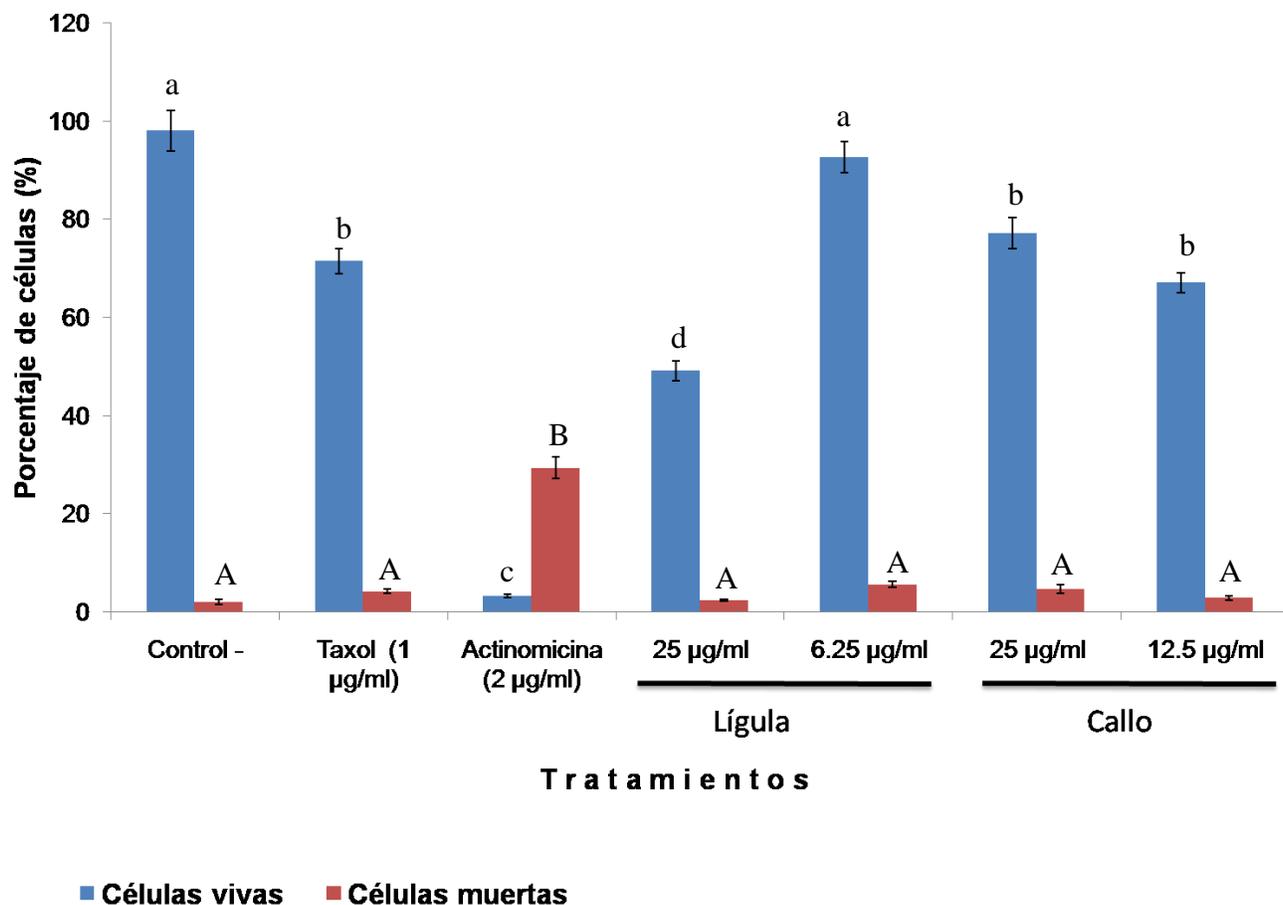
### **8.3 Determinación de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano.**

La viabilidad celular se evaluó con el método de exclusión azul de tripano después de las 24 h de exposición de las células con los extractos de lígula y callo de cempaxúchil.

Como control positivo del efecto citotóxico para evidenciar el proceso de apoptosis, se presentan células tratadas con taxol<sup>®</sup> (1 µg/ml sigma, USA) y actinomicina (2 µg/ml, Gibco, Israel) que son compuestos en los que se ha observado la inducción de muerte celular por apoptosis (Figura 13).

La concentración de 25 µg/ml del extracto de lígula, mostró que la viabilidad de las células fue de 49.15% el cual se puede considerar bajo en comparación con el control negativo que mostró un 98%, sin embargo el porcentaje de células muertas fue de 2.4%. Lo que sugiere que el extracto de lígula a la concentración de 25 µg/ml no favorece la proliferación celular en la línea HeLa, e induce un bajo porcentaje de muerte celular. Sin embargo, la concentración de 6.25 µg/ml del extracto de lígula, no mostró diferencia significativa con relación al porcentaje de células vivas con respecto al control negativo, se sugiere que una ventaja es que no se observó la inducción de la proliferación celular; es decir, el cultivo permanece sin cambios. (Figura 13).

Las concentraciones de 25 y 12.5 µg/ml de callo mostraron un porcentaje de 77% y 67% de células vivas respectivamente, lo cual es similar a lo que se observó con taxol.



**Figura 13.** . Viabilidad celular con azul de tripano. Efecto de los extractos de lígula y callo de cempaxúchil sobre la viabilidad celular de la línea HeLa. Letras iguales: no hay diferencia significativa, letras diferentes; hay diferencia significativa

Los resultados sugieren fuertemente, que las concentraciones de los extractos de lígula (2.5 mg/ml) y callo (2.5 mg/ml y 1.25 mg/ml) tienen un efecto en la disminución de la proliferación celular en la línea de cáncer cérvicouterino HeLa; sin embargo, hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual se están provocando cambios en la viabilidad celular y es necesario realizar la tinción con anexina V-FITC/ yoduro de propidio, para determinar apoptosis y necrosis.

#### **8.4 Detección de apoptosis y necrosis por el método de anexina V-FITC/ yoduro de propidio**

Los resultados que se obtuvieron en las pruebas de anexina V, se observan en la figura 14. Se muestran los citogramas que corresponden al control negativo y positivos que sirvieron de referencia para los diferentes tratamientos con extractos; lígula 25 µg/ml, 6.25 µg/ml y callo 25 µg/ml, 12.5 µg/ml.

Los resultados obtenidos en las pruebas de Anexina V, se observan en la figura 14, en donde se muestran los citogramas que corresponden al control negativo (sin tratamiento) y positivo (Taxol y Actinomicina) que sirvieron de referencia para los diferentes tratamientos de extractos de lígula que se utilizaran en concentraciones de 25 µg/ml, 6.25 µg/ml y callo 25 µg/ml, 12.5 µg/ml. Los tratamientos con extractos de lígula y callo presentan una distribución de células en los cuadrantes 2 y 4 del citograma, que corresponde a un proceso de apoptosis, esto se puede observar al comparar este resultado con los controles.

Estos resultados indican que los tratamientos de callo y lígula inducen muerte del tipo apoptosis en bajas proporciones comparado con los datos que presentan los controles negativo y el control positivo con taxol, dado que el control negativo presentó un porcentaje de 0.23 % de apoptosis y el control positivo con Taxol indujo un porcentaje de 17.91 % de apoptosis a las 24 h de incubación (Tabla 3).

Se observó que cuando los extractos llegan a inducir muerte celular del tipo necrótico, lo hacen en porcentajes despreciables, que van de 0.11 a 2.5 % en los extractos de 6.25 y 25 µg/ml en lígula respectivamente. Al usar los extractos de callo en 12.5 y 25 µg/ml se obtuvo necrosis del 0.49 a 0.76 %.

El porcentaje de apoptosis temprana + tardía que se obtuvo al usar la concentración de 6.25 µg/ml de lígula fue de 10.52 % y al usar 12.5 µg/ml de callo fue de 11.57 % lo que indica que una fracción de las células están muriendo por apoptosis (Tabla 3).

Esto indica que si se lleva a cabo algún tipo de muerte celular relacionada con el uso de estos extractos, ésta no producirá inflamación de los tejidos, debido a que las células apoptóticas no liberan el contenido celular de manera indiscriminada, de lo que se puede deducir que los extractos de lígula y callo pueden estar actuando como quimioprotectores y se pueden usar para proteger de la acción de carcinógenos a las células no tumorales.

El hecho de que la tasa de proliferación (indirecta) de las células observada en estos ensayos, sea comparable con el control sin tratamiento, sugiere que los extractos no promueven la muerte celular, y que sí causan muerte, ésta ocurriría principalmente por apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte programada por el organismo, que no inducirá inflamación en las células blanco. Debido a que en la necrosis la membrana celular se rompe y libera el contenido citoplásmico que contiene las enzimas intracelulares y otros compuestos oxidantes. Todas estas moléculas producen mayor muerte celular y atraen al mismo tiempo las células de la respuesta pro-inflamatoria, lo cual no ocurre en la apoptosis (Lizarbe, 2007).

Por otro lado, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, incluyendo la radiación (que no distingue a las células sanas) y los agentes químicos como los alquilantes, inducen muerte celular del tipo apoptosis a las células de cáncer (Bold R. y col., 1997).

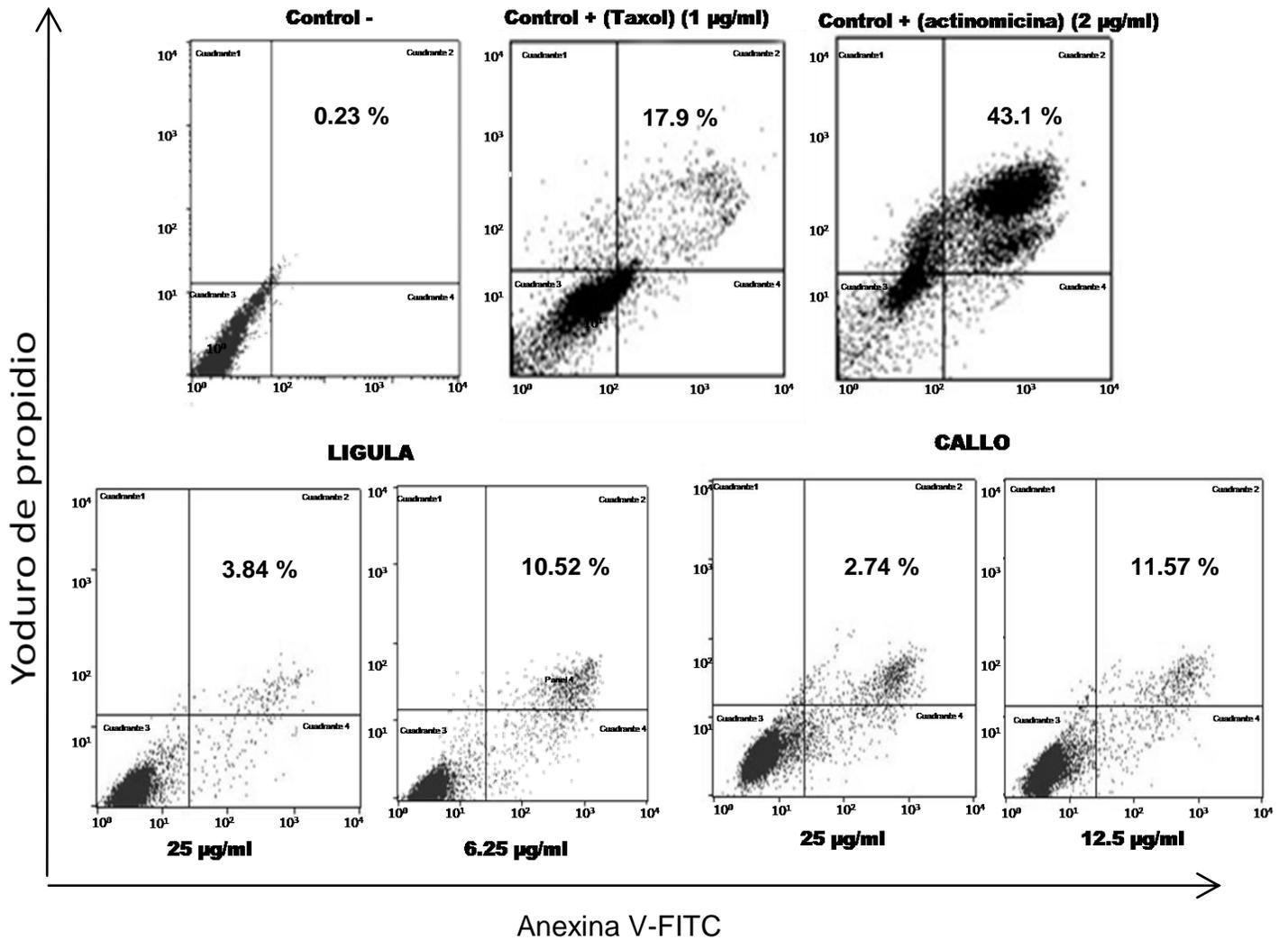
En el presente trabajo los tratamientos con los extractos de origen vegetal (cempaxúchil) en células de cáncer cervicouterino muestran menor capacidad de producir apoptosis y esto permite deducir que se comportan como quimioprotectores. Lo cual concuerda con trabajos realizados con por Palozza y col., (2001) con  $\beta$ -caroteno en donde muestra un porcentaje del 12.5 % en la inducción de apoptosis a las 24 h con una concentración de 0.43  $\mu\text{g/ml}$ .

En particular, las xantofilas, como cantaxantina y zeaxantina también tienen la capacidad de actuar como inductores de apoptosis (Palozza y col., 1998 y Maccarrone y col., 2005).

**Tabla 3.** Viabilidad celular, apoptosis y necrosis de células HeLa.

<b>Tratamiento</b>	<b>% de células viables</b>	<b>% de apoptosis</b>	<b>% de necrosis</b>
Control -	99.37	0.23	0.4
Taxol (1 µg/ml)	80.42	17.91	1.67
Actinomicina D (2 µg/ml)	56.3	43.1	0.59
Lígula 25 µg/ml	93.66	3.84	2.5
Lígula 6.25 µg/ml	89.37	10.52*	0.11
Callo 25 µg/ml	96.5	2.74	0.76
Callo 12.5 µg/ml	87.94	11.57*	0.49

Por otro lado, Quing-Yi y col., (2005), reportaron que la luteína extraída de aguacate no tiene efecto citotóxico en células de cáncer de próstata. Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de que luteína es el pigmento mayoritario en el cempaxúchil (lígula y callo), existe la combinación de dos pigmentos (luteína y zeaxantina) lo que sugiere que probablemente estén actuando de forma conjunta, es decir, puede existir, una acción sinérgica de los compuestos en el extracto.



**Figura 14.** Efecto del extracto de callo y lígula en la línea celular de cáncer cérvicouterino (Hela) sobre la muerte celular programada (Apoptosis). Células necróticas (Cuadrante 1), células en apoptosis tardía (Cuadrante 2), células en apoptosis temprana (Cuadrante 4) y células viables (Cuadrante 3)

## 8.5 Tratamiento digital de imágenes (TDI) de células HeLa

Para llevar a cabo el TDI, se utilizaron micrografías capturadas de las células HeLa a las 24 h de incubación con los extractos de lígula y callo de cempaxúchil en eventos independientes (Figura 15 D,E,F,G) y sus respectivos controles positivos. El taxol (inhibe el crecimiento celular y activa la apoptosis en células de cáncer (Soo-Jung y col., 2004)) y la actinomicina (inhibe la síntesis de proteínas por inhibición de la transcripción). Se utilizaron células sin tratamientos (Figura 15A) las cuales presentaron formas poligonales lo cual coincide con lo reportado por Jum-Xia Xiao y col. (2007), en donde se puede observar la morfología celular sin tratamiento.

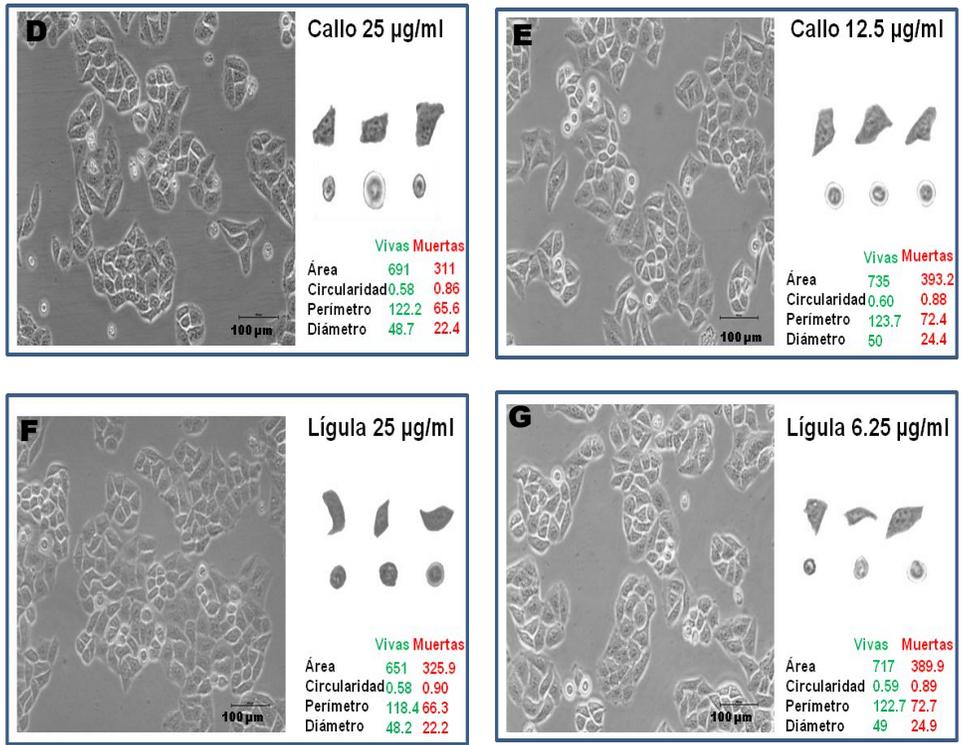
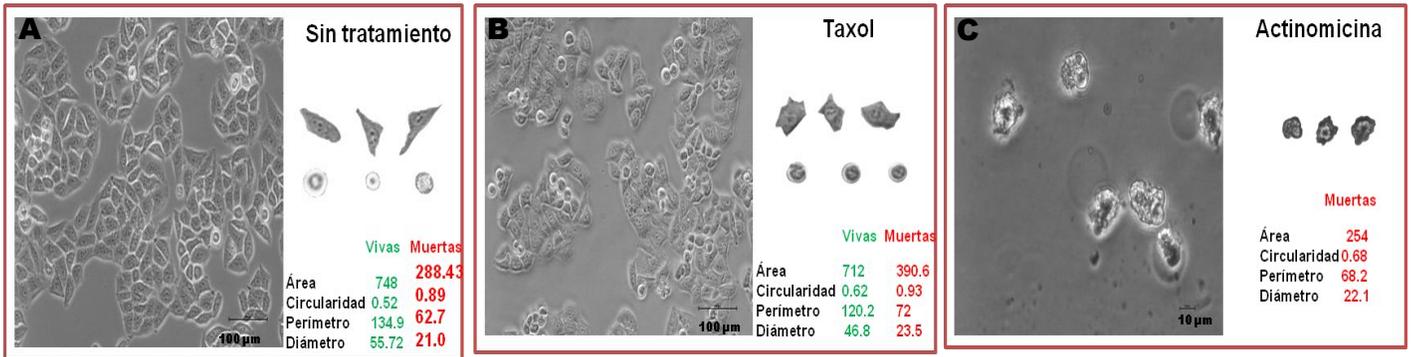
Con el tratamiento digital de imágenes a las células segmentadas de cada tratamiento se les determinaron los siguientes parámetros: área, perímetro, circularidad y diámetro de Feret. Las células con los extracto de lígula y callo mostraron un área de entre 691-717 mm<sup>2</sup>, este dato es menor en comparación con las células vivas del control negativo que fue de 748 mm<sup>2</sup>. Por otro lado, las células muertas de los tratamientos mostraron un área de 311 a 393 mm<sup>2</sup>, diferente al área del control negativo que fue de 288.43 mm<sup>2</sup> (tabla 4). Es decir, el área de las células vivas en los tratamientos disminuyó y el de las células muertas aumentó en área con respecto al control negativo (sin tratamiento).

Con relación al perímetro, las células vivas en los tratamientos de lígula y callo midieron entre 118 y 123 mm, en donde se muestra una diferencia significativa con el control negativo que fue de 135 mm, pero no hubo diferencia significativa con las células vivas del control positivo (taxol) que midieron 120 mm (tabla 4), lo que indica que el perímetro en las células vivas en los tratamientos (lígula y callo) disminuyó con respecto al control negativo. En los resultados obtenidos en el perímetro de las células muertas, se obtuvo lo siguiente; las células tratadas con callo 12.5 µg/ml y lígula 6.25 µg/ml, presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo y fueron iguales a las del control con el taxol, es decir, su perímetro aumentó con

estas concentraciones. Con callo (25  $\mu\text{g/ml}$  y lígula 25  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó un perímetro igual al control negativo (Tabla 4).

Otra medida es la circularidad, en la cual se evidencia la característica circular de las células muertas que tienden a 0.9 en todos los casos excepto en actinomicina en donde presenta una circularidad de 0.7. Y en el caso de las células vivas en los tratamientos (lígula y callo) tiende a 0.5-0.6 (tabla 4). Este factor se refiere a que tan circular es un objeto, de tal forma que un círculo perfecto tiene un valor de 1.0. El resultado del diámetro de las células vivas de los tratamientos con callo y lígula mostró diferencia significativa con respecto al control negativo y muy parecido al control con taxol. Sin embargo, la morfología que presentaron las células con actinomicina fue diferente a todos los tratamientos.

Con estos resultados se sugiere que las células HeLa expuestas a diferentes concentraciones del extracto de lígula (25, 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ), mostraron cambios morfológicos de la célula, observando el mismo resultado en las distintas concentraciones del extracto de callo (25, 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Una característica fundamental de la célula cancerosa es la pérdida de su capacidad para mantener un equilibrio (Homeostasis), es decir han perdido el balance entre la proliferación y la muerte (Rodríguez y col., 2004). Sin embargo, en los resultados con los extractos de cempaxúchil evaluados sobre las líneas celulares cancerosas HeLa, se observó que las células se redondearon y perdieron su adherencia a la placa, lo que es típico de células que detienen su crecimiento. También se puede observar que las células mostraron pérdida de adhesión celular, es decir las células se retraen y perdieron el contacto con otras células vecinas, la membrana adquiere apariencia vesicular lo cual corresponde a la morfología característica de células apoptóticas (Jordán, 2003, Kanduc, y col., 2002). Estos resultados sugiere que los extractos derivados de callo y lígulas tiene un posible efecto citotóxico sobre las células HeLa ya que se observaron cambios morfológicos que pudieron relacionarse con características físicas de las células, como es el caso de la adherencia a la placa, la circularidad y pérdida de la adhesión celular, asociado a células apoptóticas.



**Figura 15.** Micrografías del extracto de callo y lígula, el control negativo y los controles con Taxol (1 µg/ml) y actinomicina sobre la viabilidad celular de la línea de cáncer Cérvicouterino (HeLa).

**Tabla 4.** Datos del área, perímetro, circularidad y Diámetro de Feret de células en los distintos tratamientos con sus respectivos controles. Media  $\pm$  error estándar.

	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Circularidad	Diámetro de Feret
<b>Células vivas</b>				
Control -	748 $\pm$ 21	134.87 $\pm$ 2.24	0.52 $\pm$ 0.008	55.72 $\pm$ 1.02
Control + (taxol)	712 $\pm$ 18	120.20 $\pm$ 1.76	0.62 $\pm$ 0.009	46.78 $\pm$ 81.5
Control + (Actinomicina)	—————	—————	—————	—————
Lígula 25 $\mu$ g/ml	651 $\pm$ 14.1	118.41 $\pm$ 1.64	0.59 $\pm$ 0.007	48.21 $\pm$ 76.4
Lígula 6.25 $\mu$ g/ml	717 $\pm$ 18.9	122.68 $\pm$ 2.12	0.59 $\pm$ 0.008	49.02 $\pm$ 76.4
Callo 25 $\mu$ g/ml	691 $\pm$ 17	122.16 $\pm$ 1.92	0.59 $\pm$ 0.008	48.72 $\pm$ 92.9
Callo 12.5 $\mu$ g/ml	735 $\pm$ 19.3	123.68 $\pm$ 2.06	0.60 $\pm$ 0.008	50 $\pm$ 97.5
<b>Células muertas</b>				
Control -	288.43 $\pm$ 11.8	62.76 $\pm$ 1.31	0.89 $\pm$ 0.006	21.02 $\pm$ 0.5
Control + (taxol)	390.65 $\pm$ 8.59	71.99 $\pm$ 8.0	0.94 $\pm$ 0.003	23.49 $\pm$ 0.4
Control + (Actinomicina)	374 $\pm$ 24.5	77.26 $\pm$ 2.82	0.76 $\pm$ 0.01	26.01 $\pm$ 10.2
Callo 25 $\mu$ g/ml	311.09 $\pm$ 16	65.6 $\pm$ 1.7	0.87 $\pm$ 0.007	22.39 $\pm$ 0.65
Callo 12.5 $\mu$ g/ml	393.25 $\pm$ 24.3	72.39 $\pm$ 1.74	0.88 $\pm$ 0.005	24.43 $\pm$ 0.6
Lígula 25 $\mu$ g/ml	325.9 $\pm$ 1.00	66.32 $\pm$ 1.09	0.90 $\pm$ 0.005	22.24 $\pm$ 0.3
Lígula 6.25 $\mu$ g/ml	389.96 $\pm$ 16	72.73 $\pm$ 1.43	0.89 $\pm$ 0.006	24.90 $\pm$ 0.6

## IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron luteína y zeaxantina, en los extractos de lígula y callo, mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Los extractos de cempaxúchil que se obtuvieron a partir de lígula y callo inhiben la proliferación celular.
- Se sugiere que los extractos derivados de callo y lígulas tiene un posible efecto citotóxico sobre las células HeLa, ya que se observaron cambios morfológicos que pudieron relacionarse con características físicas de las células, como es el caso de la adherencia a la placa, la circularidad y pérdida de la adhesión celular, asociado a células apoptóticas
- Se evidenciaron cambios morfológicos en las células Hela, como son tamaño y forma, asociados a la actividad de los agentes químicos utilizados: taxol, actinomicina y extractos de lígula y callo.
- Se sugiere que la actividad de los pigmentos de cempaxúchil, lígula y callo sobre los cultivos de células HeLa es como agente químico protector; debido a que se observó un bajo porcentaje de apoptosis, lo que indica que al ser aplicados no se promueven un proceso de tipo inflamatorio, como ocurriría en caso de necrosis, donde la liberación del contenido celular provoca la inflamación de los tejidos.

## **X. PERSPECTIVAS**

Estudiar los posibles mecanismos de acción de los extractos de *Tagetes erecta* L. en células cancerígenas.

Evaluar la estimulación de las rutas de respuesta anti-oxidante y su posible actividad a nivel de DNA.

Evaluar el efecto citotóxico en otras líneas celulares derivadas de cáncer además de probar con otras concentraciones del extracto.

## XI. LITERATURA CITADA

- Agarwal S. y Rao A. V. 1998. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: A human dietary intervention study. *Lipids* 33: 981-984.
- Alves-Rodríguez A. y Shao A. 2004. The science behind lutein. *Toxicology* 15: 57-83.
- Arias Z. M., Angarita V. M. J., Aguirre C. A. M., Restrepo F. J. M. y Montoya V. C. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivo de células vegetales.
- Armenta A., Guerrero I. y Huerta S. 2002. Astaxanthin extraction in from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the caroprotein complex. *Journal of food Science* 67: 1002-1009.
- Asai A., Sugawara T., Ono H. y Nagao A. 2004. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin a in mice and hepg2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* 32: 205-211.
- Bartley G. E. Scolnick P. A. 1995. Plan carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027-1038.
- Bertram J. S. y Bortkiewicz H. 1995. Dietary carotenoids inhibit neoplstic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *American Journal Clinical Nutrition* 6: 1327-1337.
- Biesalski H. 2001. Evidence from Intervention Studies. En: Walter P, Hornig, D, Moser, U (eds): *Functions of vitamins beyond Recommended Dietary Allowances*. *Bible Nutrition Dieta* 55: 92-134.
- Bold R. J, Termuhlen P. M, McConkey D. J. Apoptosis, cancer, and cancer therapy. *Surgical Oncology* 1997;6:133-42.
- Breithaupt D. W. y Bamedi A. 2002. Differentiation between lutein monoester region isomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography- mass spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry* 50:66-70.
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9:1551-1558.
- Britton G., Liaaen- Jensen S. y Pfander H. 2004. *Carotenoids Handbook*. Birkhauser, Basel. USA.

- Caldas M. L. y Hurtado G. H. 2006. Fundamentos generales del procesamiento y análisis de imágenes aplicados en biología. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 2: 219-229.
- Chew B. P., Wong M. W. y Wong T. S. 1996. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Research* 16: 3689–3694.
- Cuttriss A.J. y Pogson B.J. 2004. Carotenoids In Plant Pigments and Their Manipulation (ed. K. M. Davies), CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp 57–91.
- Danial N. N. y Korsmeyer S. J. 2004. Cell death: critical control points *Cell*. 116: 205-219.
- De Vita V., Hellman S. y Rosenberg S. A. 2001. *Cáncer, principios y prácticas de oncología*. Volumen 1. 5 Edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España 1540.
- Del Villar-Martínez A. A. 2003. Caracterización Molecular y expresión *in vitro* de las  $\beta$ - y  $\epsilon$ -licopeno ciclasas de cempaxúchil (*Tagetes erecta*). Tesis Doctoral. Centro de investigación de estudios avanzados del IPN. Irapuato, Gto.
- Del Villar-Martínez A. A., Serrato-Cruz M. A., Solano Navarro A., Arenas-Ocampo M. L., Quintero-Gutiérrez A. G., Sánchez- Millan J. L., Evangelista-Lozano S., Jiménez Aparicio A. R., García-Jiménez F. A. y Vanegas-Espinoza P. E. 2007. Carotenoides en *Tagetes erecta* L. la Modificación genética como alternativa. *Revista Fitotecnia* 30: 109-118.
- Del Villar-Martínez A. A., García-Sarcedo S. P., Cárabez-Trejo A., Cruz-Hernández. A. y Paredes-López. O. 2005. Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *Journal Plant Physiology* 162: 1046-1056.
- Delgado-Vargas F., Jiménez A. R. y Paredes-López O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:176–271.
- Delgado-Vargas F. y Paredes López O. 1996. Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72:283-290.
- Delgado-Vargas F. y Paredes-López O. 2003. Chemicals and colorants as nutraceuticals. En: *Natural Colorants for Food and Nutraceuticals Uses*. CRP.Press.Boca Raton, Florida U.S.A 257-305.

- Demmig-Adams B., Gilmore A. M. y Adams W. W. 1996. *In vitro* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10: 403-412.
- Dosne C. 2006 Células HeLa como prototipo del cultivo celular inmortalizado. *Medicina Buenos Aires* 66:487- 488.
- Dowdy S. C. 2002.Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer. *American Journal Obstetrics Gynecology* 186: 1167-73.
- Dominguez Rojas. 2008, Efecto del ester fenetílico del ácido cafeico (cape) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares *in vitro*, Tesis de maestría en Ciencias en la especialidad de biomedicina molecular. Mexico, D.F.
- Evan G. L. Vousden K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.*Nature* 411:342-348.
- Felzl L., Pacáková V., Štulík K. y Volka K. 2005. Reliability of carotenoid analyses: a review. *Current Analytical Chemistry* 1:93–102.
- Freshney I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. USA. Editorial John Wiley y Sons, Inc.
- García-Chavarria M. 2007. Expresión transitoria del gen *uidA* en células de *Tagetes erecta*. Tesis de Maestría en Desarrollo de Productos Bióticos. CEPROBI-IPN. Yautepec, Morelos.
- Galicia F. 1994. La ofrenda floral del día de muertos como fuente de germoplasma de cempoaxóchil. *Memorias del XV Congreso de Fitogenética*. Monterrey, Nuevo León 25-30.
- Giuliano G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P. y Taylor, M.A. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* 26: 139-145.
- Hadden W. L., Watkins R. H., Levy L. W., Regalado E., Rivadeneira D. M., Van B. R. B. y Schwartz S. J. 1999. Carotenoids composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10: 4189–4194.
- Handelman G. J. 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* 17: 818-822.

- Hantz H. L., Young L. F. y Martin K. R. 2005. Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Experimental Biology and Medicine* 230:171–179.
- Heinonen M.I., Ollilainen V., Linkola E. K., Varo P.T. y Koivistoinen P. E. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J Agricultural and Food Chemistry* 37:655– 659.
- Hernández M., Sabanero M., Barbosa G. y Gallegos M. 2006. Estaurosporina y dexametasona, inductores apoptotico en células corionicas y transformadas.. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana. 2° Congreso Nacional de Química Médica.
- Hornero-Méndez D. y Britton G. 2002. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS Letters* 515:1336.
- Hoyoku N., Michiaki M., Harukuni T. y Yoshiko S. 2009. Cancer prevention by carotenoids. *Arch Biochemistry and Biophysics* 483: 165–168.
- Huerta S., Goulet E. J., Huerta-Yeppez S. y Livingston E. H. 2007. Screening and detection of apoptosis. *Journal Surgical Research* 139: 143-156.
- [http://7art-screensavers.com/free-clipart/7art-00406\\_tagetes-tenuifolia-bright-flower.shtml](http://7art-screensavers.com/free-clipart/7art-00406_tagetes-tenuifolia-bright-flower.shtml).
- [http://blog.clementeviven.com/?page\\_id=94](http://blog.clementeviven.com/?page_id=94).
- [http://www.seedsofchange.com/garden\\_center/product\\_details.aspx?item\\_no=PS13416](http://www.seedsofchange.com/garden_center/product_details.aspx?item_no=PS13416).
- <http://www.hort.cornell.edu/4hplants/Flowers/images/French%20Marigold.jpg>.
- Ibaraki Y. y K. Kenji. 2001. Application of image analysis to plant cell suspension cultures. *Computers and electronics in Agricultura* 30: 193-203.
- Jasso R. D., Angulo-Sánchez, J. L. y Hernández-Castillo F. D. 2006. An overview of the antimicrobial properties of Mexican medicinal plants. *Naturally Occurring Bioactive Compounds* 14: 325-337.
- Jiménez-Medina E., García-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A. y Garrido F. 2006. A new extract of the plant calendula officinalis produces a dual *in vitro* Effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cáncer* 6:119
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22:100-106.

- Jun-Xia X., Guo-Qing H., Cai-Ping Z., Dan-Dan R. y Sheng-Hua Z. 2007. Morphological study on apoptosis HeLa cell induced by soyasaponins. *Toxicology in Vitro* 21: 820-826.
- Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., Siniglia E., Simba A., Natale C., Santacroce R., Di Corcia M., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroc S., Simone S., Bucci R. y Farber E. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *International Journal Of Oncology* 21: 165-170.
- Khachick F., Carvalho L., Bernstein S. P., Muir G. J., Zhao D. y Katz N. B. 2002. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoides and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine* 227:845-851.
- Kimura M. Delia B. y Rodriguez-Amaya. 2002. A scheme for obtaining standars and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry* 78: 389-398.
- Kotake-Nara. E., Kushro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K. y Nagao A. 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *Journal of Nutrition* 131: 3303-3306.
- Krinsky Norman I. 1993. Effects of carotenoids on cells. *Molecular Aspects of Medicine*. pp 241-246.
- Lakshminayana R., Sathis V. U. Dharmesh M. S. y Baskaran V. 2010. Antioxidant and cytotoxic effect of oxidized lutein in human cervical carcinoma cells (HeLa).
- Larcher W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin. p. 506.
- Lazcano, A. H. 2000. Cáncer Cérvico uterino. Prevención diagnóstico y control. Ed Médica Panamericana 254.
- Leigh W., Watkins R., Levy L., Regalado E., Rivedeneira D., Van Breemen R. y Schwartz S. 1999. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 47: 4189-4194.
- Litz R. E. y Jarret R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somatic y organogenesis. En: cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca w. M. y Mroginski L. A., Eds. CIAT. Cali, Colombia 143-171.
- Lizarbe Irracheta. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales* 101: 2-33.

- Levy J., Karas M. y Amir H. 1996. Lycopene inhibits cancer cell proliferation by delaying cell cycle progression in G1 phase. 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands) 18-23.
- Navarrete-Bolaños J. L., Rangel-Cruz C.L., Jiménez-Islas H., Botello- Álvarez E. y Rico-Martínez R. 2005. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International* 38:159–165
- Maccarrone M. M. Bari V. Gasperi B. Demmig-Adams. 2005. The photoreceptor protector zeaxanthin induces cell death in neuroblastoma cells. *Anticancer Research* 25: 3871–3876.
- Mares-Perlman J. A. E., Millen T., Ficek S. E. y Hankinson. 2002. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *Journal Nutrition* 132: 518S-524S.
- Martínez B. 2003. Identificación de las betalainas producidas por cultivo de células de *Beta vulgaris* L. var. "Crosby Egyptian" en diferentes sistemas (callo y suspensión celular). Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN. Yautepec, Morelos.
- Martínez M. 1993. Las plantas medicinales de México. 6ta. Edición. Editorial Botas, pp. 250–251.
- Martínez-Peña M., Cortés-Cuevas A. y Ávila-González E. 2004. Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempaxúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel en pollos de engorda. Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- Martínez S. M. 2009. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Colombiana de Biotecnología*. 2: 152-166.
- Mathews-Roth M. M. 1991. Recent progress in the medical application of carotenoids, *Pure Applied Chemistry* 63: 147–156.
- Meléndez-Martínez A. J., Vicario I. M. y Heredia F. J. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Universidad de Sevilla. España. Vol. 54 No 2.
- Meléndez-Martínez A. J., Britton G., Vicario I. M. y Heredia F. J. 2005. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 6362–6367.

- Michaud D. S., Feskanich D., Rimm E. B., Colditz G. A., Speizer F. E., Willett W. C. y Giovannucci E. 2000. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am. Journal Clinical. Nutrition* 72: 900–997.
- Mínguez M. M. I. 1996. Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos. Universidad de Sevilla, España. Capitulo 2 Pigmentos Carotenoides. Pag. 43-58.
- Moehs C. P., Li T., Osteryoung K. W. y DellaPenna D. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology* 3: 281-293.
- Monedero J. 1999. Teoría de la imagen digital: conceptos básicos. Aplicaciones Informáticas en Arquitectura, Barcelona, Ediciones UPC.
- Mouly P. P., Gaydou E. M. y Corsetti J. 1999. Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. *Journal of Chromatography* 844: 149–159.
- Mroginski L., Sansberro P. y Flaschland E. 2004. Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* 35-42.
- Mulabagal V. y Tsay S. H. 2004. Plants cell Cultures- An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 1: 29-48.
- Naranjo-Modad S., López-Munguía A., Vilarem G., Gaset A., Bárzana E. 2000. Solubility of purified lutein obtained from *Tagetes erecta* in supercritical O<sub>2</sub> and the effect of solvent modifiers. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 48: 5640-5642.
- Navarrete-Bolaños J. L., Rangel-Cruz C. L. Jiménez-Islas H., Botello-Álvarez E. y Rico-Martínez R. 2005. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International* 38: 159-165.
- Organización Mundial de la Salud. 2007. Control integral del cancer cervicouterino. Guía de practicas esenciales.
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Cáncer (document de internet). Disponible en <http://www.who.int/topics/cancer/es>.
- Palozza P., Torellia C., Boninsegna A., Simonea R., Catalano A., Meleb M. C. y Piccic N. 2009. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer* 283: 108-117.

- Palozza P., Calviello G., Serini S., Maggiano N., Lanza P., Ranelletti F.O. y Bartoli G. M. 2001.  $\beta$ -Carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radical Biology Medicine* 30: 1000–1007.
- Palozza P. Maggiano N. G. Calviello P. Lanza E. Piccioni F. O. Ranelletti, G. M. Bartoli. 1998. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines, *Carcinogenesis* 19. 373–376.
- Pérez-Molphe E. M., Ramírez-Malagón R., Nuñez-Palenius H. G. y Ochoa-Alejo N. 1999. *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Pertusa-Grau J. F. 2004. *Técnicas de Análisis de Imágenes Aplicados en Biología*. Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Pläsier B., Lloyd D.R., Paul G. C., Thomas C. R. y Al-Rubeai M. 1999. Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *Journal of immunological Methods* 229: 81-95.
- Pogson B., McDonald K. A., Truong M., Britton G. y DellaPenna D. 1996. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* 8:1627–39.
- Pogson B.J., Rissler H.M. y Frank H.A. 2006. The roles of carotenoids in energy quenching. In *Photosystem II: the Water/ Plastoquinone Oxidoreductase in Photosynthesis* Springer, Dordrecht, The Netherlands 515–537.
- Prabhala R. H., Braune L, M. y Garewal H,S. 1993. Influence of  $\beta$ -carotene on Immune Functions. *Annals of the New York Acadademy of Science* 691: 262-264.
- Radice S. 2004. Morfogénesis in vitro. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Echnique V., Rubinstein C. y Mroginski L. Eds. Ediciones INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. Argentina. Pp 25-33.
- Reed J. 2000. Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* 157: 1415-29.
- Rodríguez F. L., Hernández B. E. y Reyes E. J. 2004. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. *Biotecnología Aplicada* 21:60- 69.
- Rodríguez-Diez G. y Orea T. A. 2004. "Muerte Celular por Apoptosis". Capítulo 11. En: Ferez S, Lupi E. *Comportamiento del Miocardio en la Isquemia y en la Reperusión*. México D.F. Elsevier Ed pp 859-862.

- Rodriguez L. J., Pérez M. y Fonseca C. E. 2006. Cultivo celular de líneas de melanoma humano. Instituto de Investigaciones Biomedicas Alberto Sols. CSI/UAM. Madrid, España. 21: 263-267.
- Prasad K. y Cole W. 2006. Antioxidants in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 24: 8-9.
- Quing-Yi Lu., Arteaga J. R., Zhang Q., Huerta S., Liang V. W. y Heber D. 2005. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid- soluble bioactive substances. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 23-30.
- Rahman A., Iqbal M. y Thomsen W. 2001. Bioassay techniques for drug development. Harward Academic Publishers.
- Ramos-Viveros. V. 2007. Análisis ultraestructural de células desdiferenciadas de cempaxúchil (*Tagetes erecta*). Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Del Villar-Martínez A. A, Ríos-Salomé L. B., Paredes-López O., Jiménez-Aparicio A. R., Cruz-Hernández A., y Vanegas-Espinoza P. E. 2011. Análisis de los procesos de desdiferenciación y rediferenciación en explantes foliares de cempaxúchil (*Tagetes erecta*). *Agrociencia*. En revisión.
- Rivas J. D. 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *Journal Chromatography* 464:227-442.
- Rodríguez-Amaya D. 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49: 38-47.
- Rodríguez-Amaya D. A. 2000. Guide to Carotenoid Analysis in Foods. OMNI, Washington. USA.
- Sánchez-Torres G., Infante-Vázquez O., Sánchez-Miranda G., León-Peña A. y Martínez M. R. 2003. Mechanical factors of cardiovascular risk in systemic arterial hypertension. A new sign of arterial rigidity. *Archivos de Cardiología de México* 73: 261-270.
- Sanchez O. P. M. 2008. Efecto de la época de transplante sobre la acumulación de luteína en inflorescencias de cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.) Tesis Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos bióticos. Yautepec, Morelos.

- Scott C. E. y Eldridge A. L. 2004. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 551-559.
- Serrato-Cruz M. A. 1994. Variabilidad de la autoincompatibilidad en *Tagetes erecta* L. En: Memorias del 11º Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética. Sociedad Mexicana de Citogenética. Chapingo, México.
- Serrato-Cruz M. A. 2004. Colecta, caracterización y aprovechamiento de *Tagetes erecta* L. como ornamental. *Avances. Metodología de Investigación*. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 1-109.
- Serrato-Cruz M. A. 2006. Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Cempasúchil (*Tagetes* L.) Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). México, p 100.
- Serrato-Cruz M. A. y Quijano A. 1994. Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión Bibliográfica (1984-1992). Memorias I Simposium Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible Tradicional. CEICADAR. Colegio de Postgraduados. Puebla, México. pp: 228-238.
- Simpson K. L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamine A. *Proceeding of the Nutrition Society* 42: 7-17.
- Soo-Jung P., Ching W., Joh D. G., Xiaoling Z., Armaghan E. y Ahmad R. Safa. 2004. Taxol Induces Caspase-10- dependent Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 51057-51067.
- Soule J. A. 1993. *Tagetes minuta*: A potential new herb from South American. In: *New Crops*. J. Janick J. E Simon (eds). Wiley, New York. pp: 649-654.
- Stahl W. y Sies H. 1996. Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 336: 1-9.
- Suffness M. y Pezutto J. M. 1991. Assays related to cáncer drug discovery. In "Methods in Plant Biochemistry". Hostettmann, K., ed. Academic Press Limited 6: 71-133.
- Tsao R., Yang R., Young C. Zhu H. Manolis T. 2004. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography A* 1045: 65-70.
- Tucker K. G., Chalder S., Al-Rubeai M. y Thomas C. R. 1994. Measurement of hybridoma cell number, viability and morphology using fully automated image analysis. *Enzyme Microbial Technology* 16-29.

- Tun Suárez, J. 1990. Evaluación de las condiciones óptimas para el establecimiento *in vivo* de *Tagetes erecta* (cempaxúchil). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario. Conkal, Yucatán.
- Turner B. L. 1996. The Comps of Mexico-A systematic account of the family Asteraceae, VI.Tageteae and Anthemideae. *Phytologia Memoirs* 10:1-93.
- Ukiya M., Akihisa T. y Yasukawa K. 2006. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of pot marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal Nature Products* 69:1692-1696.
- Vanegas-Espinoza P. E., Ramos-Viveros V., Jiménez-Aparicio A. R., López-Villegas E. O. Heredia F. J., Cruz-Hernández, Quintero-Gutiérrez A. G., Paredes-López O. y Del Villar-Martínez A. A. 2011. Plastid analysis of pigmented undifferentiated cells of *Tagetes erecta* L. by transmission electron microscopy. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*.
- Vasudevan P., Kashyap S. y Sharma S. 1997. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresource Technology* 62:29-35.
- Vega-Avila E., Espejo-Serna A., Alarcón-Aguilar F. y Velasco-Lezama R. 2009. Cytotoxic Activity For Mexican Medicinal Plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc* 52: 78-82.
- Vicencio J., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Younes A., Maiuri M., Lavandro S. y Kroemer G. 2008. Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* 54: 92-99.
- Weiss, G. R. 1997. *Oncología Clínica*. Ed. El Manual Moderno , S. A. de C. V. México, D. F. 542.
- Wyllie A. H., Kerr J. F. R. y Currie A. R. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251-307.
- Zhang A., Helen Y., David L. y Yew T. 2004. Apoptosis –A Brief Review. *Neuroembryology* 3:47-59.