



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia

**Inducción de la fragmentación del DNA en
líneas celulares leucémicas y normales de
ratón por extractos de *Sechium* spp.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

JORGE DAVID CADENA ZAMUDIO

Director de Tesis: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

ABRIL 2013



Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo de, UNAM PAPIIT (IN225610), ICyTDF (PICSA 10-156), Conacyt (104025) y el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México, A.C. (GISEM).

La investigación fue llevada bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio, con la colaboración del Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISEM).

A los miembros del jurado integrado por el Dr. Benny Weiss Steider, el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, el Dr. Juan José Rodríguez Mercado, el M. en C. Edgar Ledesma Martínez y la Biól. Itzen Aguiñiga Sánchez; quienes con sus valiosos consejos y aportaciones guiaron la culminación exitosa del presente trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Bertha y Jorge, quienes con su incondicional apoyo, amor, comprensión, tiempo y paciencia, me han guiado hasta este momento, para finalizar una de las principales metas en mi vida, pues ustedes son el motor que me lleva de un lado a otro, el apoyo que requiero siempre y en todo lugar, y la sapiencia que me impulsa a tomar las mejores decisiones, GRACIAS POR TODO, LOS AMO.

A mis hermanos, Nieves y Daniel, quienes siempre han estado a mi lado para platicar conmigo, para sacarme una sonrisa en los momentos difíciles, para tolerar mis momentos de estupidez y aun así seguir a mi lado apoyándome, para brindarme su amor, consejos, y apoyo para no dejarme solo en ningún momento, LOS AMO.

A mi novia Paulina, quien siempre me ha apoyado, tolerado, y acompañado durante todo este proceso de aprendizaje personal, académico y espiritual, GRACIAS, pues siempre has estado a mi lado, para darme tu AMOR INCONDICIONAL.

Al Doctor Edelmiro Santiago, quien me brindó la oportunidad de realizar el presente trabajo en su laboratorio. Gracias por su tiempo, paciencia, apoyo y guía; de igual manera a Itzen, por brindarme su tiempo y amistad.

A mis amigos, Paola, Yadira, Eric, Leonardo y Cesar, gracias por brindarme una amistad excepcional y apoyo incondicional, pues con ustedes he pasado momentos inolvidables, gracias por todo.

De igual manera le agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, con un agradecimiento de manera especial a Aide y Ana, quienes con su apoyo y tiempo, me ayudaron de manera incondicional para la realización de este trabajo.

INDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LINEAS CELULARES LEUCÉMICAS Y NORMALES DE RATÓN POR EXTRACTOS DE *SECHIUM* SPP. 1

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1.	Muerte celular.....	4
2.2.	Necrosis	5
2.3.	Cornificación	5
2.4.	Catástrofe mitótica.....	5
2.5.	Anoikis	5
2.6.	Entosis.....	6
2.7.	Paraptosis	6
2.8.	Piroptosis	6
2.9.	Apoptosis	7
2.10.	Morfología de la apoptosis.....	8
2.11.	Fases de la apoptosis.....	10
2.12.	Apoptosis, oncogenes y proto- oncogenes	12
2.13.	Genes promotores de tumores: Oncogenes	13
2.14.	Genes de supresión tumoral.....	15
2.15.	Genes reparadores de errores replicativos	17
2.16.	Principales genes reguladores de la apoptosis.....	17
2.17.	Familia Bcl-2-Bax	17
2.18.	Proteína Bcl-2.....	18
2.19.	Gen Bax.....	19
2.20.	Gen c-myc	20
2.21.	Gen p53.....	21
2.22.	El Gen p53 y su proteína.....	22
2.23.	El Papel de p53 en la apoptosis	23
2.24.	Caspasas.....	24
2.25.	Ruta intrínseca de la apoptosis.....	25
2.26.	Papel del citocromo C: Formación del apoptosoma.....	27
2.27.	Ruta extrínseca de la apoptosis	30
2.28.	Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca.....	31
2.29.	Principales nucleasas implicadas en la degradación del ADN durante el proceso apoptótico	32
2.30.	CAD (endonucleasa activada por caspasa).....	32
2.31.	EndoG	36
2.32.	Métodos utilizados para la detección de apoptosis	39
2.33.	Las plantas como fuente de principios activos.....	41
2.34.	Extractos de plantas como alternativas antineoplásicas	42
2.35.	Origen del género <i>Sechium</i> spp.	43
2.36.	Antecedentes directos.....	46
2.37.	Planteamiento del problema.....	47

3. JUSTIFICACIÓN.....	48
4. HIPÓTESIS	49
5. OBJETIVOS.....	49
5.1. Objetivo general.....	49
5.2. Objetivos particulares	49
6. METODOLOGÍA	50
6.1. Material biológico	50
6.1.1. Líneas celulares.....	50
6.1.2. Cultivo de líneas celulares.....	51
6.1.3. Cultivo de células mononucleadas de médula ósea (cmn).....	51
6.2. Variables	52
6.2.1. Anexina V.....	52
6.2.2. Fragmentación internucleosomal del ADN	53
Una vez que las células fueron estimuladas con la IC50 de los tratamientos (extractos vegetales) para cada línea celular a sus respectivos tiempos (48, 60, 68 horas), se colectaron por centrifugación convencional en una centrifuga (HERMLE Z300K) a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante ocho minutos a 17 °C con lo cual se obtuvo el botón celular, posteriormente se realizó un lavado con PBS (1ml) y se resuspendió hasta que el botón se encontrará totalmente disuelto, y de nueva cuenta se centrifugó a las condiciones antes mencionadas.	53
6.2.3. Manejo general para el cultivo celular	56
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
7.1. Efecto de los extractos crudos sobre la proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón J774 y P388.	57
7.2. Efecto de los extractos vegetales crudos sobre la translocación de fosfatidilserina en líneas leucémicas mieloides de ratón J774 Y P388.	59
7.3. Detección de la fragmentación internucleosomal del ADN en líneas celulares leucémicas mieloides de ratón J774 Y P388.....	65
7.4. Efecto de las IC50 más altas de los extractos de <i>sechium</i> spp., sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1.	68
7.5. Efecto de la IC50 más alta de los extractos vegetales sobre la translocación de fosfatidilserina en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1	70
7.6. Detección de la fragmentación internucleosomal del ADN en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1.	71
8. CONCLUSIONES.....	77
9. PERSPECTIVAS.....	78
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

TABLAS

Cuadro 1. Descripción de oncogenes. Los tipos de cáncer listados en esta tabla son aquellos asociados predominantemente con cada oncogén pero esta lista no es exhaustiva (Modificado de Domínguez, 2008).....	14
Cuadro 2. Descripción de Genes de Supresión Tumoral (Modificado de Domínguez, 2005).*Los tipos de cáncer listados en esta columna son aquellos asociados predominantemente con cada supresor de tumor pero esta lista no es exhaustiva.....	16
Tabla 3. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células J774 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.	61
Tabla 4. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células P388 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.	63
Tabla 5. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.....	71

FIGURAS

Figura 1. Cuadro comparativo de las diferencias morfológicas entre: A) Apoptosis B) Necrosis....	10
Figura 2. Imagen donde se muestran las diferentes fases de la apoptosis	12
Figura 3. Cromosoma 17 que contiene la ubicación del gen p53, localizado en el brazo corto del cromosoma.	22
Figura 4. Modelo de activación de caspasas	24
Figura 5. Formación del complejo apoptosomal durante la vía intrínseca de la apoptosis.	28
Figura 6. Vías de señalización apoptótica: Ruta extrínseca de la apoptosis e intrínseca	29
Figura 7. Vías de señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis, donde se muestran las rutas de ambos ligandos de muerte	31
Figura 8. Modelo de síntesis de DFF40 en el citoplasma y DFF45 unido a la cadena naciente	33

Figura 9. Proceso de degradación del ADN mediado por la endonucleasa CAD	35
Figura 10. Reducción de la densidad celular en J774 observada bajo el microscopio (10X) después de 68 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp</i> A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	57
Figura 11. Reducción de la densidad celular en P388 observada bajo el microscopio (10X) después de 60 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	58
Figura 12. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células J774 a las 68 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	60
Figura 13. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células P388 a las 60 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	62
Figura 14. Fragmentación internucleosomal del ADN de células J774 a las 68 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	66
Figura 15. Fragmentación internucleosomal del ADN de células P388 a las 60 horas de estímulo con la IC ₅₀ de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i>) F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	67
Figura 16. Densidad celular observada de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 bajo el microscopio (10X) después de 68 horas de estímulo con las IC ₅₀ más altas de cada uno de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: <i>Sechium edule var. nigrum spinosum</i> F: <i>Sehium compositum</i> , G: <i>Sechium chinantlense</i>	69
Figura 17. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 después de 68 horas de estímulo con las IC ₅₀ más altas de cada uno de los extractos vegetales de <i>sechium spp.</i> , A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5	

μM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* F: *Sehium compositum*, G: *Sechium chinantlense*..... 70

Figura 18. Fragmentación internucleosomal del ADN después de 68 horas de estímulo con las IC₅₀ más altas de cada uno de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* F: *Sehium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.
..... 72

ABREVIATURAS

Abl Gen Abelson

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNasa Desoxirribonucleasa

AIF Factor inductor de apoptosis

AIP1/Alix Actina de interacción proteína 1

ALG-2 Asparagina-glicosilación 2

Apaf-1 Factor activador de proteasas apoptóticas

Apaf-1 Factor activador de proteasas apoptóticas

Ara-C® Citarabina

ARF Factor de ADP-ribosilación

ARN Ácido ribonucleico

ATCC American Type Culture Collection

Bad Inductor de muerte asociado a Bcl-2

BAR Tasa de apoptosis basal

Bax Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2 Células de Linfoma B2

Bcl-Xs Células B De linfoma extra-grandes

Bcr-abl Oncoproteína expresada por el gen Bcr-Ab

BID Agonista letal que interacciona mediante dominios BH3

Ca Calcio

CAD Endonucleasa activada por caspasa

CARD Dominio de reclutamiento de caspasas

Caspasas Cisteinil-aspartato proteasas

CD-1 Cepa de ratón CD-1

Cdc25A Proteína fosfatasa que participa en la activación del complejo CDK1/CycB.

CDK Quinasas dependientes de ciclina

CDK2 Quinasas dependientes de ciclina 2

CDK4 Quinasas dependientes de ciclina 4

CDKI Quinasas dependientes de ciclina 1

CE Con espinas

Cel Células

CMN Cultivo de Células Mononucleadas de Médula Ósea

CO₂ Dióxido de carbono

CSA Actividad estimuladora de colonias

DD Dominio de muerte

DED Dominio efector de muerte

DNF Factor de fragmentación del ADN

DNF35 Factor de fragmentación del ADN
35

DNF40 Factor de fragmentación del ADN
40

DNF45 Factor de fragmentación del ADN
45

DISC Complejo de inducción de muerte

EndoG Endonucleasa G

EUA Estados Unidos de América

FADD Dominio de muerte asociado a Fas

Fas Proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular"

FITC Isotiocianato de fluoresceína

GISeM Grupo interdisciplinario de investigación en *Sechium edule* en México

GST Glutatión s-transferasa

HDM2 Ubiquitina ligasa E3

Hrk Activador de apoptosis harakiri

HTLV-1 Virus linfotrópico de células T humano Tipo 1

HTLV-II Virus linfotrópico de células T humano Tipo 2

IAP's Proteínas inhibidoras de apoptosis

IC₅₀ Concentración de inhibición media

IGFR-1 Factor de crecimiento receptor de insulina tipo 1

IL- 18 Interleucina 18

IL-1 Interleucina 1

IL-1 β Interleucina 1 beta

IL-3 Interleucina 3

IL-8 Interleucina 8

IMDM Iscove's Modified Dulbeco's Medium

J774 Línea celular leucémica macrofágica de ratón

kb Kilobases

L-929 Línea celular de fibrosarcoma de pulmón

LMA Leucemia mieloide aguda

LPS Lipopolisacárido bacteriano

M Molar

MAPK Proteína quinasasa ctivada por mitógenos

MC29 Gen transformante del virus de la mielocitomatosis aviar MC29 (v-Myc)

MCF-7 Línea celular de cáncer de mama por antonomasia

Mcl-1 Proteína de Inducción de la leucemia mieloide y diferenciación de células

Mg Miligramos

ml Mililitros

MOMP Permeabilización de la membrana externa mitocondrial

Myc Oncogén identificado en tumores víricos (virus aviar de myelocytomatosis)

NCCD Comité de Nomenclatura de Muerte Celular

NF-KB Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Noxa Forbol-12-miristato-13-acetato-inducida por la proteína 1

Omi/HtrA2 Requisito de alta temperatura proteína A2/ estrés regulado de endoproteasa

P388 Línea celular leucémica macrófaga de ratón

p53 Proteína anti-oncogénica, supresora de tumores

PARP Poli ADP ribosa polimerasa

Pb Pares de bases

PBS Solución buffer de fosfatos

pH Potencial de hidrógeno

pml-rar-alfa Ácido retinoico alfa del receptor

PS Fosfatidilserina

PTP Formación de poros permeables de transición

Puma Modulador de la apoptosis upregulated 53

RNAsa Ribonucleasa

S. Sechium

SFB Suero fetal bovino

Smac/DIABLO Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP

SP1 TTSSs Salmonella isla de patogenicidad 1/ sistema de secreción tipo III

SV40 Virus de simios tipo 40

TNF Factor de necrosis tumoral

TNF-R Factor receptor de necrosis tumoral

TTSSs Sistema de secreción tipo III

Tunel del inglés: *Terminal dUTP Nick End-Labeling*

µl Microlitros

µg Microgramos

V Voltios

Z-VADFMK Carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil-[O-metil] – fluoromethylketone

INDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LINEAS CELULARES LEUCÉMICAS Y NORMALES DE RATÓN POR EXTRACTOS DE *Sechium* spp.

1. Introducción

El cáncer es un problema de salud pública creciente a nivel mundial y que afecta a personas de todas las edades. Esta es una enfermedad producida por diversos cambios en la conducta de las células que surgen por alteraciones en la información genética, debido a lo cual estas células proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva destruyendo tejidos y órganos normales (Karp, 1998).

Los cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Yocota, 2000), tales como, la radiación ultravioleta, emisiones radiactivas, infecciones recurrentes con organismos patógenos, exposición a compuestos químicos carcinogénicos, daños en el sistema inmune, desequilibrio endócrino, edad y condiciones fisiológicas del organismo (Weinberg, 1996).

El cáncer se clasifica de acuerdo al tipo de tejido donde progresa, tales como: Sarcomas procedentes de tejido conjuntivo (huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos), tejido muscular y tejido adiposo; los carcinomas que provienen de tejido epitelial (piel y epitelios que recubren las cavidades y órganos) y finalmente las leucemias y linfomas cuyo origen es en el tejido hematopoyético (tejido formador de células sanguíneas) y linfoide, que producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea. Algunos ejemplos de tumores malignos son el fibrosarcoma de pulmón, leucemias y carcinoma de cérvix (Pardo, 1998).

2. Marco teórico

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas. Se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos que carecen de función e invaden otros órganos y tejidos del cuerpo presentando insuficiencia hematopoyética, provocando la muerte por anemia, sangrado o infecciones (Montesinos y Mayani, 2002; Miranda y Gutiérrez, 2002).

La leucemia se divide en dos grandes grupos: crónica y aguda; éstas a su vez se clasifican en mieloides y linfoideas dependiendo del progenitor celular del que se derive. Las leucemias crónicas se caracterizan por su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Estas células interfieren en la producción de linfocitos y granulocitos que presentan características morfológicas similares a células maduras pero no son funcionales (Kantarjian *et al.*, 1988). Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la acumulación de células “blásticas”, pudiendo ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética, o bien de sus descendientes. Este tipo de leucemia también se clasifica en linfoide y mieloide siendo esta última la que más incidencia de muertes provoca en las personas adultas (Gutiérrez, 2006).

Las posibles causas biológicas de la leucemia pueden ser producidas por infecciones con virus como los retrovirus HTLV-1 y HTLV-II, la modificación genética que conduce a la activación de oncogenes como: myc, abl, bcl-2 y ras, al igual que la formación de genes quiméricos como bcr-abl (leucemia aguda linfoblástica y mielocítica crónica) o pml-rar-alfa (leucemia aguda promielocítica) éstos, probablemente son algunos de los factores genéticos que contribuyen a la proliferación clonal anormal dando origen a este tipo de cáncer; la leucemia puede ser provocada también por la acción de algunos agentes tóxicos (benceno, cloranfenicol, fenilbutazona, antineoplásicos del tipo alquilantes, etc.) por daño cromosómico previo (translocación del cromosoma filadelfia, síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia tipo fanconi, BCR/ABL,) y por inmunodeficiencias, que aparentemente

predispone al desarrollo posterior a la leucemia (Kelly y Gilliland, 2002; Deininger *et al.*, 2000; Mergold Villaseñor, 2004; Mendoza Vásquez, 2011).

Grupos de investigación especializados en leucemia han encontrado alteraciones en genes relacionados con el ciclo celular, inmortalización, estabilidad genómica, crecimiento y uno de los aspectos más importante como lo es la evasión de muerte por apoptosis (Labardini, 2006). De esta forma las células leucémicas proliferan sin control en ausencia de diferenciación y muerte por apoptosis, lo cual les confiere ventajas de crecimiento sobre las células que participan en la hematopoyesis normal (Jandl, 1991; Cousar, 1999).

Los tratamientos que se utilizan actualmente para combatir a la leucemia son: Quimioterapia, trasplante de médula ósea, inmunoterapia y bloqueadores de blancos moleculares. La mayoría de los agentes anticancerígenos ejercen su actividad cuando la célula se está dividiendo, activando el mecanismo de apoptosis de las células cancerígenas. Sin embargo estas terapias tienen efectos secundarios que constituyen un alto riesgo de daño a las células normales, deteriorando la calidad de vida del paciente y la mayoría de los casos la eficiencia terapéutica es reducida (Tallman *et al.*, 2005). Debido a la falta de selectividad de los agentes anticancerígenos y a la resistencia que desarrollan algunas células cancerígenas a dichos productos, la tasa de sobrevivencia a largo plazo en la leucemia mieloide aguda (LMA) es de aproximadamente el 20% (Setzer y Setzer, 2003; Estey 2009), por lo que es necesario encontrar nuevos agentes antitumorales que se traduzcan en nuevas estrategias terapéuticas para solucionar problemas hemato-oncológicos.

2.1. Muerte celular

En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis celular mantiene el estado de diferenciación de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación y su tiempo de vida de acuerdo con las necesidades del organismo, eliminando aquéllas que han cumplido sus funciones, o que están dañadas ya sea a nivel celular o genético. De esta manera la muerte celular toma un papel fundamental para el equilibrio fisiológico del organismo (Jiménez, 2003).

Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo los más comunes la necrosis y la apoptosis. Aunque estos dos tipos de muerte tienen algunas características en común, presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica, de esta forma es posible identificar cada mecanismo de muerte celular (Dubin *et al.*, 2000).

La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a sus características morfológicas (apoptosis, necrosis, muerte celular autofágica o muerte celular asociada con mitosis), de acuerdo a criterios enzimológicos (con o sin participación de nucleasas o de diferentes tipos de proteasas como caspasas, calpainas, catepsinas y transglutaminasas), de acuerdo a aspectos funcionales (muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica) o de acuerdo a características inmunológicas (inmunogénica o no inmunogénica). Es por ello que el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) ha propuesto una clasificación y definición actualizada de las diferentes modalidades de muerte celular (Kroemer *et al.*, 2009) que se han descrito hasta el momento y que brevemente, se describen a continuación.

2.2. Necrosis

Es un fenómeno degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, puede ser consecuencia de un trauma ambiental como temperaturas extremas, isquemia, daño mecánico y generalmente como respuesta a una lesión grave, este proceso de muerte celular presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis, en estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios (Fink *et al.*, 2005; Alfaro *et al.*, 2000). La necrosis siempre se ha considerado como una muerte celular accidental no programada, pero actualmente se están acumulando evidencias de que la muerte celular necrótica puede estar finamente regulada (Kroemer *et al.*, 2009).

2.3. Cornificación

Es una muerte celular programada, específica de la epidermis, morfológica y bioquímicamente diferente de la apoptosis. Este proceso permite la formación de corneocitos, que son queranocitos muertos con una mezcla de proteínas y lípidos necesarios para la resistencia mecánica, elasticidad y estabilidad estructural de la epidermis (Galluzzi *et al.*, 2012).

2.4. Catástrofe mitótica

Término acuñado por Russell y Nurse; este tipo de muerte celular ocurre durante o justamente después de una mitosis fallida. Se acompaña de características morfológicas que incluyen la micronucleación (fragmentos de cromosomas que no han sido bien repartidos entre las células hijas) o multinucleación, debido a una incorrecta separación de núcleos. El hecho de que este fenómeno pueda derivar en apoptosis o necrosis, hace que se recomiende el uso de la expresión “muerte que ocurre durante la metafase” por ser más preciso e informativo (Galluzzi *et al.*, 2012).

2.5. Anoikis

Literalmente significa "el estado de estar sin hogar", este término de origen griego antiguo fue introducido por Frisch y Francis en 1994 para describir la respuesta apoptótica de las células adherentes debido a la ausencia de la célula-matriz. Este tipo de apoptosis es inducida por la pérdida de adhesión al sustrato o a otras células. Sin embargo hay que tener

en cuenta que otros procesos de muerte celular pueden darse tras la pérdida de adhesión al sustrato que no tienen características apoptóticas (Galluzzi *et al.*, 2012).

2.6. Entosis

Define una modalidad de muerte celular en la que una célula es internalizada por otra célula vecina y, posteriormente, desaparece mediante degradación lisosomal. La entosis no es inhibida por Bcl-2 ni por Z-VADFMK. Se ha descrito que células de cáncer de mama MCF-7 sufren entosis cuando se les priva de adhesión al sustrato (Galluzzi *et al.*, 2012).

2.7. Paraptosis

Este término se introdujo para describir un tipo de muerte celular programada con características morfológicas y bioquímicas diferentes de la apoptosis. La Paraptosis ha sido recientemente caracterizada como la vacuolización citoplasmática asociada con aumento de volumen mitocondrial y del retículo endoplasmático, el cual no responde a la inhibición de las caspasas y no existe formación de cuerpos apoptóticos u otras características morfológicas de ésta. En muchos tipos celulares la paraptosis se puede disparar por el IGFR-1 (Factor de crecimiento receptor de insulina tipo 1) y cursa con una extensiva vacuolización citoplasmática y aumento del volumen mitocondrial. No puede inhibirse por Bcl-2 ni por inhibidores de caspasas y en su señalización están implicados miembros de la familia de MAPK; pero es posible inhibir la paraptosis por medio de la proteína AIP1/Alix, que interactúa con otra relacionada a muerte, ligante de calcio ALG-2, sugiriendo que este tipo de muerte es totalmente distinta de la apoptosis (Galluzzi *et al.*, 2012; Kroemer *et al.*, 2009).

2.8. Piroptosis

Esta vía de muerte celular es dependiente únicamente de la caspasa-1. Esta caspasa no está involucrada en la muerte celular apoptótica y su función es procesar los precursores de las citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-18, activándolos. Esta forma de muerte se ve por ejemplo en células infectadas con *Salmonella*, donde se produce la activación de la caspasa-1, por sustancias efectoras, liberadas a través del sistema SPI TTSS (SPI-1 (Salmonella pathogenicity island 1) y sistema de secreción tipo III (type III secretion systems (TTSSs)). Esta activación de la caspasa-1 lleva a la fragmentación del ADN y a la lisis celular, ambos

por vías diferentes. Esta forma de muerte celular ha sido descrita principalmente en macrófagos e implica la activación de la caspasa-1 y la liberación de IL-1 β y de IL-8, citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio. Los macrófagos que sufren piroptosis presentan características morfológicas de la apoptosis y de la necrosis (Galluzzi *et al.*, 2012; Kroemer *et al.*, 2009).

2.9. Apoptosis

El termino apoptosis procedente del griego (appo-toe-sis), significa “caída natural de las hojas en otoño”, y fue propuesto por la similitud morfológica entre ambos eventos (Domínguez, 2005).

El proceso se caracterizó inicialmente en su vertiente morfológica y sobrevivió más de 15 años en latencia. Gracias a estudios de los aspectos bioquímicos y moleculares, iniciados por Brenner en el nematodo *Caenorhabditis Elegans*, y posteriormente, con el descubrimiento de un patrón característico “en escalera”, al analizar el ADN de las células apoptóticas en un gel de electroforesis, hoy día es uno de los procesos investigados con mayor vigor (Domínguez, 2005; Fernández, 2009).

La apoptosis fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Curie de la Universidad de Edimburgo, y se basó en las características morfológicas que presentan las células tales como la organización de la membrana citoplasmática, condensación de la cromatina, entre otras. Es durante los años ochenta que se describe la participación de la apoptosis en procesos patológicos y fisiológicos y durante los años noventa se vuelve uno de los principales tópicos de estudio dentro de la biología (Alfaro *et al.*, 2000).

La apoptosis es una muerte fisiológica o muerte celular programada, que se puede presentar ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y ésta muere en beneficio del organismo; este tipo de muerte celular se acompaña de redondeo, retracción de pseudópodos y reducción del volumen celular. Por otro lado también se observa condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, poca o ninguna modificación ultraestructural de citoplasma, y el mantenimiento de una membrana plasmática celular intacta hasta las últimas etapas del proceso (Kroemer *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2005). Algunas de sus características bioquímicas son la activación de

caspasas, de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, pérdida de potencial mitocondrial, fragmentación del ADN y exposición del fosfolípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plásmica, entre otras. La apoptosis no debe considerarse sinónimo de muerte celular programada, porque existen otros tipos de muerte celular programada que no tienen las características morfológicas de la apoptosis. Tampoco debe considerarse sinónimo de activación de caspasas, ya que la activación de estas también puede estar asociada a procesos biológicos no letales, aunque para la adquisición de las características apoptóticas se requiera de las caspasas (Kroemer *et al.*, 2009; Wyllie, 1980; White, 1996; Kerr *et al.*, 1972).

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentarán diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula. Existen estímulos y momentos clave que activan proteínas para desencadenar la cascada apoptótica, éstos pueden ser por anomalías en la replicación o transcripción del genoma de ADN en cada ciclo celular o mutaciones por agentes tóxicos, químicos o físicos provenientes del exterior (Roseto y Brenner, 1999). Para determinar la muerte por apoptosis se emplean diferentes marcadores, desafortunadamente no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Otro factor importante es que a pesar de que se induzca apoptosis en células que se encuentran en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico, por lo que la búsqueda de un marcador tanto *in vivo* como *in vitro* es representativo de un momento específico (Alfaro *et al.*, 2000).

2.10. Morfología de la apoptosis

La apoptosis se considera, morfológica y bioquímicamente, diferente a la muerte celular por necrosis. En este último fenómeno la muerte es un proceso "pasivo" que no requiere síntesis proteica (Arango *et al.*, 1997), donde la muerte celular es resultado de un daño directo causado por estímulos externos, que usualmente inicia en la superficie de las células, éstas se hinchan, pierden la integridad de membrana alterando la regulación de la homeóstasis iónica celular y permitiendo un gran edema intracelular, se inicia la destrucción de orgánulos y la lisis temprana antes de cualquier alteración morfológica;

como consecuencia se provoca una intensa respuesta inflamatoria que participará, igualmente, en la fagocitosis de los detritus celulares (Fernández, 2009; Domínguez, 2005).

Contrariamente, la apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática (Arango *et al.*, 1997). Inicialmente se produce la constricción de la membrana, disminuyendo el tamaño celular y agrupando los orgánulos, dándole al citoplasma un aspecto más denso. Los cambios nucleares son los rasgos más característicos, como son: Condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, lo que conlleva a masas densas bien definidas, y durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Cohen, 1993; Wyllie *et al.*, 1984). Estos cuerpos apoptóticos se componen de citoplasma y orgánulos muy agrupados (excepto mitocondrias y ribosomas), pudiendo contener también fragmentos nucleares, rodeados siempre de membrana. Los cuerpos de apoptosis serán fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradarán con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática. Seguidamente las células adyacentes serían capaces de migrar o proliferar reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (Fernández, 2009; Domínguez, 2005; Arango *et al.*, 1997).

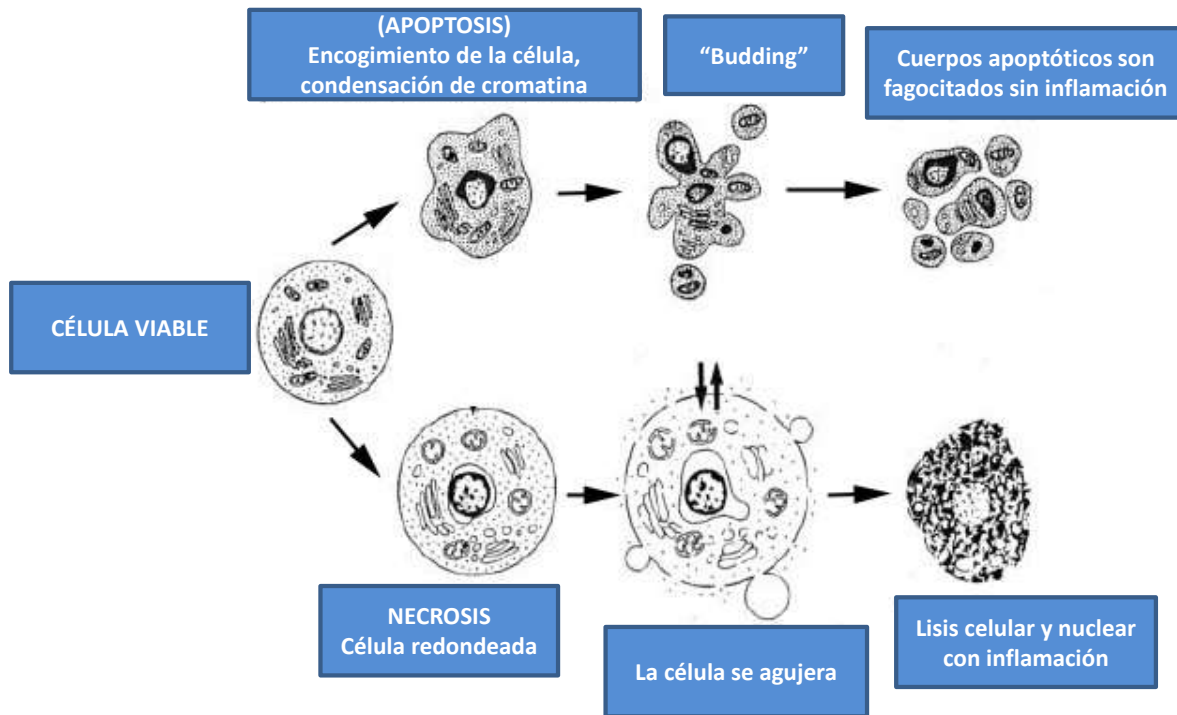


Figura 1. Cuadro comparativo de las diferencias morfológicas entre: A) Apoptosis B) Necrosis (Tomado y modificado de Gewies, 2003).

2.11. Fases de la apoptosis

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o fase efectora, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis; y por último en la etapa de eliminación o degradativa, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes, a continuación se describen más a fondo cada una de estas fases.

Fase de iniciación; que se inicia con una inducción dependiente del estímulo de muerte y seguida por la fase de transducción de señales correspondiente. El estímulo inductor es muy variado incluyendo agentes químicos y físicos, activadores fisiológicos, asociados a terapias, y toxinas, también puede iniciarse por unión de Fas a su ligando. En cualquier caso, se entra en una ruta de transducción de señales activada tras el daño que el estímulo produce en las macromoléculas biológicas, o por acción sobre receptores específicos (CD95/Fas/TNF-R). Esta fase se caracteriza por la condensación del citoplasma y la

compactación de la cromatina dando lugar a la formación de densos agregados que se deslocalizan para situarse junto a la membrana nuclear y el aumento en el contenido de calcio (Ca^{++}) intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular produciendo cambios en el tamaño y forma celular, los cuales son indicativos de una adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte (Cascales, 2003; Kroemer *et al.*, 2009).

Fase efectora; en la que la célula está programada para morir, activando las proteasas, las cuales están implicadas en los procesos de muerte celular, donde se encuentran las caspasas, las calpaínas, la granzima B y el complejo multiproteico denominado proteosoma. De todas las anteriores las de mayor relevancia son las caspasas, pues tienen lugar en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares; éstas hidrolizan secuencias específicas de tetrapéptidos que contienen un residuo aspartato. Entre sus sustratos se encuentran: elementos del citoesqueleto (actina, fodrina, proteína Tau y catenina), enzimas encargadas de reparar (PARP) o degradar (ADNasa) el ADN celular, factores de transcripción (retinoblastoma, HDM2), proteínas reguladoras (proteína cinasa C, fosfatasa 2A, cinasas de adhesión focal), así como miembros de la familia del oncogen Bcl-2 (BID). Esta fase se caracteriza por la detección de ADN en fragmentos olionucleosomales de 180 a 200 pb (pares de bases) (o múltiplos de éstos), además se produce la dilatación del retículo endoplásmico que origina la formación de vesículas que tienden a unirse a la membrana plasmática adquiriendo una forma característica en burbujas (blebbing) (Cascales, 2003; Jordán, 2003).

Fase degradativa; en la que las células muertas son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos que son atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas. La muerte celular se produce después de grandes alteraciones nucleares de la membrana plasmática y de las mitocondrias. En el núcleo se degrada el ADN y se hace visible condensaciones de cromatina nuclear formándose aglomeraciones que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear (Cascales, 2003; Jordán, 2003).

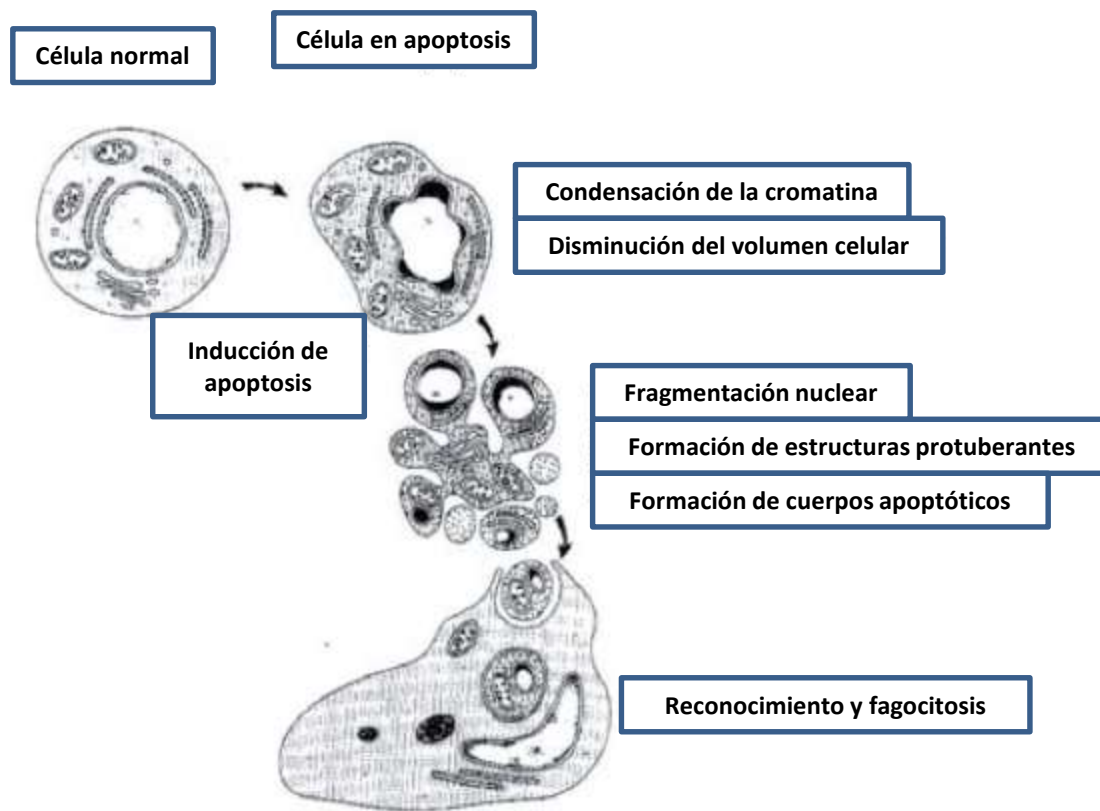


Figura 2. Imagen donde se muestran las diferentes fases de la apoptosis (Tomado de Yerbes-Cadenas, 2010).

2.12. Apoptosis, oncogenes y proto- oncogenes

La investigación sobre alteraciones de la apoptosis se ha dirigido últimamente a intentar detectar anomalías en los genes implicados en el control y regulación de este proceso (Miret, 2003). Existen genes implicados en la regulación del ciclo celular, replicación y reparación del ADN, cuyas mutaciones hacen más susceptibles a las células para que se transformen en neoplásicas. Son los llamados genes tumorales de los cuales se identifican tres tipos: Oncogenes, genes supresores tumorales y genes reparadores de errores replicativos del ADN (McMahon, 1994).

2.13. Genes promotores de tumores: Oncogenes

Se denomina oncogén a la forma mutada de un gen normal o protooncogén, el cual codifica para una proteína normal, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas. Estas moléculas, generalmente relacionadas con la proliferación (comúnmente receptores o reguladores de la transcripción) celular o con la apoptosis, al sobreexpresarse se convierten en oncogenes. La forma mutada u oncogén puede sobre expresar la proteína normal o bien expresar una proteína anormal que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras, por lo que el resultado neto es una ganancia de función. Esto conduce, según el caso, a la proliferación descontrolada o a una apoptosis reprimida y en definitiva, a la aparición del cáncer (Domínguez, 2008).

De entre los genes que integran el genoma humano se han caracterizado unos 100 protooncogenes, generalmente son genes dominantes y se ha observado que sólo es necesaria la mutación de un alelo para producir alteraciones en el crecimiento y la diferenciación normal (Munnes *et al.*, 1998). La activación de un oncogén puede contribuir al desarrollo del cáncer de dos maneras: mediante la activación de los procesos de proliferación celular y mediante el bloqueo de los procesos de senescencia y muerte celular. La activación de un oncogén es el resultado de una o varias mutaciones en un protooncogén que alteran estructural y funcionalmente su producto, estas alteraciones pueden ser a nivel génico en donde el gen puede sufrir mutaciones que afecten los exones de modo que se altere la estructura de sus productos y con ello su actividad biológica (proteínas truncadas, proteínas mal plegadas, etc) o la mutación puede ocurrir sobre *enhancers* (*potenciadores*) cercanos a la región del promotor de modo que el producto normal se expresa en cantidades anormalmente altas. Otra forma de alteración es a nivel cromosómico en donde puede ocurrir un rearreglo del cromosoma, que traslada al oncogén desde una localización distante a un sitio próximo a un promotor o un *enhancer* muy activo de la transcripción, lo que conduce a un aumento de su tasa de expresión o una alteración en el marco de lectura (Gibbs, 2000; Marshall, 1992).

Cuadro 1. Descripción de oncogenes. Los tipos de cáncer listados en esta tabla son aquellos asociados predominantemente con cada oncogén pero esta lista no es exhaustiva (Modificado de Domínguez, 2008).

Oncogén	Función	Cáncer
abl	Actividad tirosina quinasa	Leucemia mielógena crónica
abl/bcr	Nueva proteína causada por fusión	Leucemia mielógena crónica y linfocítica aguda
alk	Codifica un receptor tirosina quinasa	Linfomas
ALK/NPM	Proteína nueva creada por fusión	Linfomas de células grandes
aml1	Codifica un factor de transcripción	Leucemia mieloide aguda
aml1/mtg8	Proteína nueva creada por fusión	Leucemias agudas
axl	Codifica un receptor tirosina quinasa	Cánceres hematopoyéticos
bcl-2, 3, 6	Bloquea la apoptosis (muerte celular programada)	Leucemias y linfomas de células B
bcr/abl	Proteína nueva creada por fusión	Leucemias mielógena crónica y linfocítica aguda
c-myc	Proliferación celular y síntesis de ADN	Leucemia; carcinomas del colon, estómago, seno, pulmón, y cérvix; neuroblastomas y glioblastomas
erbB	Tirosina quinasa	Glioblastomas y carcinomas de células escamosas
erbB-2	Tirosina quinasa	Carcinomas del seno, ovario, y glándula salivaria
fos	Osteosarcoma	Cáncer en hueso
HER2/neu	Proteína nueva creada por fusión	Carcinomas del seno y el cervix
int-2	Codifica un factor de crecimiento de fibroblasto	Carcinomas del seno y células escamosas
jun	Factor de transcripción para API	Sarcoma
MSH2	Reparo de discordancia en el ADN	Cáncer colorectal hereditario no poliposis
myb	Codifica un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN	Leucemias y carcinomas del colon
N-myc	Proliferación celular y síntesis del ADN	Neuroblastomas, retinoblastomas, y carcinomas del pulmón
ost	Factor de intercambio de nucleótido de guanina	Osteosarcomas
raf	Serina treonina quinasa	Varios tipos de cáncer
RAR/PML	Proteína nueva creada por fusión	Leucemia aguda premyelocítica
rasH	Transducción de señales celulares	Carcinoma de la vejiga urinaria
rasK	Transducción de señales celulares	Carcinoma del pulmón, vejiga urinaria, y ovarios
rasN	Transducción de señales celulares	Carcinoma del seno
ros	Tirosina quinasa	Sarcoma
ski	Factor de transcripción	Carcinomas
Src	Tirosina quinasa	Sarcomas

2.14. Genes de supresión tumoral

La célula cuenta con moléculas que vigilan la secuencia normal de los acontecimientos genéticos que permiten su proliferación. Estos son los genes supresores de tumor (GST). (Knudson, 1993). Los genes de supresión tumoral ó GST codifican proteínas que regulan el ciclo celular, fundamentalmente paralizando o inhibiendo la proliferación celular. A diferencia del mecanismo de los oncogenes, en los cuales la carcinogénesis resulta de la ganancia de una función genética, en este caso el mecanismo de acción es la pérdida de función de estos genes, afectando el control del crecimiento y la subsecuente formación tumoral (Yokota y Sigimura, 1993).

La activación de oncogenes no constituye la única vía hacia la malignidad. En la gran mayoría de los cánceres la transformación maligna es resultado de la combinación de la activación de oncogenes y la anormal inactivación de GST. Los GST son también genes de clase II cuyos productos poseen actividad fisiológica que influencia el progreso del ciclo celular y la inducción de apoptosis. A diferencia de los protooncogenes, los GST son activadores de procesos apoptóticos o bloqueantes del progreso del ciclo celular. Los mecanismos por los cuales la expresión genética de los GST puede alterarse son similares a los de activación de oncogenes. Casi todos los tipos de cáncer humano parecen acompañarse de la pérdida o mutación de uno o más GST. Algunos incluso parecen ser causales de tipos específicos de tumores mientras que otros se hallan presentes en una amplia gama de cánceres (Brandal *et al.*, 2002; Meza-Junco *et al.*, 2006).

En todos los casos, la alteración de los GST se manifiesta con carácter recesivo, es decir se necesita la alteración de ambos alelos del gen en cuestión para provocar una alteración fenotípica que comprometa la fisiología de la célula. La alteración puede ser por mutación, delección (frecuentemente una mutación inactiva uno de los alelos, mientras que una delección afecta el otro alelo como un segundo evento) (Fernández, 2009) o heredada en línea germinal. Esta última explica en gran parte el carácter hereditario de algunos cánceres cuya frecuencia es alta en determinadas familias (formas hereditarias) y que se presentan raras veces en la población general. En las formas hereditarias inicialmente uno de los

alelos está dañado desde la línea germinal y el restante puede sufrir una mutación por cualquiera de las causas antes descriptas y expresarse la alteración. En las formas esporádicas se necesita alterar los dos alelos en una misma célula por estos mecanismos, lo que por azar es bastante difícil y estas formas son raras (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Descripción de Genes de Supresión Tumoral (Modificado de Domínguez, 2005). *Los tipos de cáncer listados en esta columna son aquellos asociados predominantemente con cada supresor de tumor pero esta lista no es exhaustiva.

Supresor de Tumor	Función	Cáncer *
APC	Controla la función de factores de transcripción específicos	Carcinomas familia adenomatosa y colorectal no heredada
BRCA1, 2	Reparo al daño del ADN	Cánceres hereditarios del seno y ovarios
CDKN2A	Lugar del gen que codifica p16 y p14ARF	Tumores cerebrales
DCC	Función aún desconocida	Carcinomas colorectales
DPC4 (SMAD4)	Regula la señalización de los receptores de factores de crecimiento	Tumores colorectales, neoplasia pancreática
MADR2/JV18 (SMAD2)	Regula la señalización de los receptores de factores de crecimiento	Cáncer colorectal
MEN1	Codifica la proteína menina que interactúa con los factores de transcripción y previene la transcripción de ciertos genes	Neoplasia múltiple endocrina tipo 1
MTS1	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina	Melanomas
NF1	Proteína activadora del RAS GTPasa	Neurofibromatosis tipo 1
NF2	Proteína activadora del RAS GTPasa	Neurofibromatosis tipo 2
p53	Codifica un factor de transcripción para p21 que detiene el ciclo celular en la fase G1	Carcinomas de la vejiga urinaria, seno, colorectal, del esófago, pulmón, próstata, y ovarios; tumores del cerebro, sarcomas, linfomas, y leucemias
PTEN	Fosfatasa lípida que regula la sobrevivencia celular	Síndrome Cowden; mayor riesgo de cánceres de tiroides y del seno
Rb	Altera la actividad de ciertos factores de transcripción que juegan papeles importantes en la división celular	Retinoblastoma, sarcomas; carcinomas de la vejiga urinaria, seno, esófago, próstata, y pulmón
VHL	Puede marcar las proteínas para la degradación	Carcinomas de células renales
WRN	Reparo del ADN	Síndrome de Werner
WT1	Represor transcripcional	Tumores de Wilms (cáncer del riñón pediátrico)

2.15. Genes reparadores de errores replicativos

Son los genes responsables de mantener la integridad del genoma y la fidelidad de la información que transfieren, en la traducción del ADN. El genoma humano codifica para aproximadamente 60,000 proteínas necesarias para la función celular normal y por lo tanto requiere una constante replicación del ADN. La tasa basal de errores de replicación espontáneos del ADN se ha estimado en más de 10,000 eventos/día. Por otro lado, la exposición a carcinógenos o un defecto subyacente en los mecanismos de reparación, aumentan significativamente los errores de replicación y facilitan la acumulación de alteraciones en el ADN necesarias para que ocurra la transformación maligna (Sherr ,2000; Sherr, 2004).

2.16. Principales genes reguladores de la apoptosis

Como se ha mencionado con anterioridad, la muerte celular programada por apoptosis es uno de los procesos celulares más importantes y representativos, y para mantener su homeostasis tanto interna como externa éste es regulado por una gran cantidad de proteínas, genes, citosinas, ciclinas, etc. En este apartado en específico, se tocarán algunos de los genes más representativos por su importancia en la regulación de la apoptosis.

2.17. Familia Bcl-2-Bax

El gen Bcl-2 fue el primer miembro encontrado en una familia creciente de genes implicados en la regulación de la apoptosis que, a diferencia de otros oncogenes, prolonga la supervivencia celular bloqueando específicamente la muerte celular por apoptosis. El gen Bcl-2 (células de Linfoma B2) se identificó hace más de una década, con el análisis y descubrimiento de la translocación 14; 18 (q32, q21), en el cromosoma 18 (Fernández, 2009).

La familia de Bcl-2 se divide en dos grandes grupos: el primero, el de las proteínas pro-apoptóticas que incluye a Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Hrk, entre otras; y el segundo, en el que se ubican las proteínas anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1, Mcl-1 (Cory, 2002). Se sabe que los miembros de la familia tienen hasta 4 dominios conservados llamados dominios homólogos de Bcl-2 conocidos como; BH1, BH2, BH3 y BH4. Una característica distintiva entre los dos grupos es que las proteínas anti-apoptóticas presentan generalmente

los cuatros dominios, mientras que las pro-apoptóticas pueden tener de 1 a 3 dominios (Gross, 2001).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis. Los miembros pro-apoptóticos como Bax pueden heterodimerizar con los anti-apoptóticos como Bcl-2 y bloquear su acción anti-apoptótica. Por tanto la relación en los niveles de expresión entre anti-apoptóticos/pro-apoptóticos determina si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, sin embargo cuando Bax está en exceso la célula está avocada a entrar en apoptosis. Bax también tiene la habilidad de heterodimerizar con Bcl-XL, por lo cual un balance entre los dos también es necesario para la inducción o represión del estímulo apoptótico (Gross, 2001).

2.18. Proteína Bcl-2

En particular, Bcl-2 una proteína de 26 kDa que se encuentra anclada a las membranas externas de las cisternas nucleares del retículo endoplásmico, y a la externa mitocondrial (García *et al.*, 2006), y que actúa además en los niveles de formación de poros permeables de transición (PTP), caspasas y membranas del retículo endoplásmico y del núcleo:

- a) **Formación de poros permeables de transición (PTP)**; los cuales forman puntos de contacto entre membrana mitocondrial externa e interna (Zoratti y Szabo, 1995; Zamzami *et al.*, 1998). Los PTP son canales de conductancia larga que dejan pasar moléculas, cuando los PTP se abren se produce la disipación del potencial de membrana y finalmente pueden producir la ruptura por hinchamiento de la membrana mitocondrial externa, dejando salir las moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana. Se ha comprobado que Bcl-2 puede mantener los poros cerrados y que Bax puede abrirlos, de hecho Bax interacciona directamente con el poro (53). Pero a su vez la liberación del citocromo c puede ocurrir incluso sin pérdida del potencial de membrana, por lo cual esta vía podría ser una especie de retroamplificación para la apoptosis (Narita *et al.*, 1998; Perales, 2005).

- b) **A nivel de las caspasas;** donde Bcl-XL puede interaccionar indirectamente con caspasa-8 y directamente con Apaf-1 o Apaf-1/caspasa-9, esta unión puede romperse por la unión de Bax a Bcl-XL. Basándose en esto se propone que Bcl-XL secuestra a estas caspasas para evitar su activación (Perales, 2005).
- c) **A nivel de las membranas del retículo endoplásmico y del núcleo.** En las membranas del retículo endoplásmico y por tanto de la envoltura externa del núcleo se encuentran localizados en abundante cantidad, Bcl-2 y Bcl-XL, donde ejercen su acción anti-apoptótica, ya que pueden heterodimerizar con miembros pro-apoptóticos o también secuestrar caspasas, como la caspasa-8, a la que se unen mediante una proteína asociada a membrana del retículo denominada P28Bap31 (Florence *et al.*, 1997).

2.19. Gen Bax

Esta es la primera proteína conocida asociada con Bcl-2 *in vivo* (Bcl-2- proteína asociada a X), una proteína de 21 kD con la habilidad de suprimir la capacidad de Bcl-2 para bloquear la apoptosis (De la Torre Fernández, 2009; Ouyang *et al.*, 1998). En algunos tejidos incluyendo mama, estómago, piel, ganglios linfáticos, colon e intestino delgado, entre otros, los patrones de expresión de Bax y Bcl-2 están regulados de forma paralela, lo que sugiere que existe un antagonismo activo entre ambas proteínas. Por otro lado, también se ha visto que la expresión de Bax se localiza, especialmente, en áreas cuyas células tienen una alta tasa de apoptosis. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel regulador de esta interacción proteína- proteína en el control de la apoptosis (Fernández, 2009).

-Bax podría funcionar como una molécula inductora de muerte celular, que es neutralizada por bcl-2.

-Bcl-2 podría funcionar como un represor de muerte celular que es neutralizado, por competencia, con una molécula inerte de Bax.

-Bcl-2 podría tener una función bioquímica totalmente expuesta a Bax (Fernández, 2009).

Como ya se mencionó, Bax es una proteína relacionada a Bcl-2 que puede contrarrestar a la misma, y promueve la apoptosis. Además una creciente cantidad de evidencia ha indicado que la expresión del gen Bax mediador paralelo con p53 funcionan como mediadores de la apoptosis. Por otra parte, se encontró que el gen Bax es activado directamente por p53; por lo tanto, Bax se cree que se requiere para la apoptosis mediada por p53 (Ouyang *et al.*, 1998).

2.20. Gen c-myc

La familia de genes MYC es una de las más ampliamente estudiadas en biología; está constituida por los protooncogenes c-Myc, n-Myc y l-Myc, que se relacionan con diferentes neoplasias en humanos. El gen más ampliamente estudiado de esta familia es el c-Myc, que fue el primero en ser descubierto mediante su homología con el gen transformante del virus de la mielocitomatosis aviar MC29 (v-Myc) (Ospina y Muñetón, 2011).

Ese gen representa la parte central de una red regulatoria transcripcional que controla la expresión de hasta el 15% de todos los genes humanos y la regulación de los procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, diferenciación, el metabolismo y la apoptosis (Hartl *et al.*, 2010).

El gen c-Myc es un elemento importante en el control de la proliferación celular, la sobreexpresión de c-Myc puede inducir bien proliferación o bien apoptosis. Este gen está localizado en humanos en el cromosoma 8q24, consta de tres exones y codifica para una proteína con función de factor de transcripción nuclear, que interviene en numerosos mecanismos celulares y vías de transducción (Hartl *et al.*, 2010; Ospina y Muñetón, 2011).

La expresión de c-Myc está muy controlada por señales externas del tipo factores de crecimiento y mitógenos. La activación de c-Myc provoca la inducción a la fase G1 del ciclo celular. Esta transición se promueve cuando quinasas dependientes de ciclina (CDK) son activadas por la asociación con las ciclinas específicas. Inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDKIs) inhiben la activación. c-Myc se ha implicado en la

inducción de ciclina D1 y D2, la ciclina E, CDK4 y Cdc25A, una fosfatasa, que activa la CDK2 y CDK4 (Hartl *et al.*, 2010; Ospina y Muñetón, 2011).

c-Myc posee además actividad proapoptótica; una de las explicaciones de esta doble acción es el hecho de que oncoproteínas como c-Myc ponen en funcionamiento toda la maquinaria proteica de la proliferación que está íntimamente ligada con la maquinaria apoptótica, por tanto, su acción sensibiliza a la célula a los estímulos apoptóticos (Perales, 2005). Los mecanismos por los que puede inducir la apoptosis son:

- Inhibición de la señal de supervivencia de la ruta NF-KB (Tanaka *et al.*, 2002).
- Activación de la proteína proapoptótica Bax que libera el citocromo c de la mitocondria (Zindy *et al.*, 1998).
- Activación indirecta de p53 vía ARF (Zindy *et al.*, 1998).
- Activación de la unión de Fas con su proteína adaptadora intracelular FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que culmina con la activación de caspasa-8 (Huebec *et al.*, 1997).

2.21. Gen p53

La proteína p53 se identificó por primera vez en 1979 en las células transformadas por el virus SV40, formando un complejo con el antígeno T, el producto proteico de dicho virus, dado que dicho antígeno es necesario para mantener el fenotipo transformado también se identificó como una proteína relacionada con la transformación y una proteína celular que se acumula en los núcleos de las células cancerosas, y diez años después fue identificada como un supresor de tumores (Debashree, 2011; Bai y Guo, 2006).

p53 pertenece a una familia de proteínas única, que incluye tres miembros: p53, p63 y p73. Aunque estas proteínas son estructuralmente y funcionalmente relacionadas unas con otras, p53 parece haber evolucionado en organismos superiores para evitar el desarrollo del tumor, regular el ciclo celular e inducir apoptosis; mientras que p63 y p73 tienen funciones claras en la biología del desarrollo normal (Bai y Guo, 2006). Actualmente se sabe que p53 que juega un papel clave en prácticamente todos los tipos de cánceres humanos, y la

mutación o la pérdida del gen p53 puede ser identificado en más de 50% de todos los casos de cáncer de humanos en el mundo (Bai y Guo, 2006).

2.22. El Gen p53 y su proteína

En humano el gen p53 contiene 11 exones y 10 intrones dentro de un dominio cromosómico de 20 kb, el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17 p13) (Debashree, 2011).

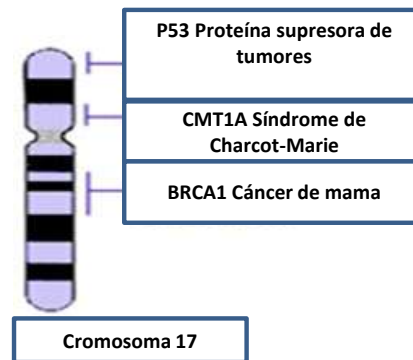


Figura 3. Cromosoma 17 que contiene la ubicación del gen p53, localizado en el brazo corto del cromosoma (Tomado y modificado de Al-Jabri, 2006).

De las muchas funciones de p53, las primeras identificadas fueron la inhibición del crecimiento anormal de las células y provocar la muerte celular programada. Debido a que estos procesos garantizan la integridad genómica o la destrucción de la célula dañada, p53 se ha llamado el guardián-del genoma (Debashree, 2011). Estas funciones son realizadas por la proteína p53 normal (“wild type”) que recibe ese nombre por ser una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, constituida por 393 aminoácidos. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos se le conocen tres dominios o unidades funcionales: el residuo de aminoácido 1 (no codificante), que contiene residuos de serina que son fosforilados por cinasas; el segundo que es el dominio central hidrofóbico; éste es responsable de unir secuencias específicas de ADN de p53 y el dominio carboxilo terminal, que contiene residuos que son fosforilados por actividad de CDK, encadenando a p53 para su actividad cinasa en el ciclo celular (Meza-Junco *et al.*, 2006).

2.23. El Papel de p53 en la apoptosis

El gen p53 es activado entre otros estímulos, en respuesta al daño al ADN, y éste sólo estimula la apoptosis cuando hay un daño muy importante en el ADN que no podrá ser reparado (Harris y Hollstein, 1993; Soussi, 1996). p53 regula la transcripción de genes en la cascada apoptótica. Dos de esos genes son Bax y Bcl-2, que son importantes en la vía apoptótica mitocondrial. En esta vía p53 puede interaccionar directamente con Bcl-2 y Bcl-XL, liberando moléculas proapoptóticas como Bak y Bax que se encuentran unidas a Bcl-2 y Bcl-XL y por tanto quedarían libres para inducir los cambios mitocondriales que llevarían a la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. De acuerdo con esto, un exceso de Bcl-XL y Bcl-2 inhibiría la liberación del citocromo-c de la mitocondria inducida por p53 (Al-Jabri, 2006; Mihara *et al.*, 2003). El dominio por el que p53 se une a Bcl-2 y a Bcl-XL, es considerado como punto caliente de mutación, ya que en muchos tipos de tumores esta zona está mutada. Al no responder la célula a la inducción apoptótica de p53, se produce una presión selectiva positiva para la formación de tumores (Perales, 2005).

p53 también puede inducir apoptosis por la activación transcripcional de genes proapoptóticos como Noxa, Puma, Bax, p53AIP, Apaf-1 y PERP, y por represión transcripcional de Bcl-2 y las IAP's (Schuler y Green, 2001; Wu *et al.*, 2009). La intensidad y la cinética de expresión de estos genes dependen de los niveles de p53, del tipo de estrés inducido y del modelo celular (Harris y Hollstein), ya que los genes inducidos por p53 críticos para su acción apoptótica pueden variar según el contexto celular.

La ruta extrínseca, es aquella en la cual están implicados los llamados receptores de muerte, pertenecientes a la familia TNF-R, los cuales mediante transducción de señales llevan a la activación de caspasas, especialmente caspasa-8 y caspasa-3. p53 puede activar esta ruta induciendo la expresión de tres proteínas transmembrana que son: Fas, DR5 y PERP (Perales, 2005).

2.24. Caspasas

Las caspasas constituyen una familia de enzimas muy conservadas en la evolución, de las cuales actualmente se han descrito 12 miembros en humano (Salvesen, 2002) y que funcionan como los componentes centrales de la respuesta apoptótica; estas son una familia de cistein-proteasas en cuyo sitio catalítico es esencial un residuo de cisteína y que cortan sus sustratos después de un residuo aspártico, de ahí su nombre (cisteinil-aspartato proteasas) (Yerbes-Cadenas, 2010; Lizarbe, 2007).

Las caspasas están presentes en las células en forma inactiva como procaspasas o zimógenos de 30-50 kDa (Gómez, 2010), las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 (17-21 kDa) y otra pequeña p10 (10-13 kDa) (Elinos-Báez *et al.*, 2001). El centro catalítico se sitúa en la subunidad p20 y contiene un residuo de cisteína, que forma parte de una secuencia de cinco aminoácidos muy conservados “QACXG” (Figura 5). El sitio de unión al sustrato lo forman tanto la subunidad p20 como la p10, pero el residuo determinante para la especificidad del sustrato lo contiene la subunidad p10. La activación del zimógeno por proteólisis, separa el prodominio y la subunidad grande de la pequeña y, posteriormente, el prodominio es eliminado (Yerbes-Cadenas, 2010).

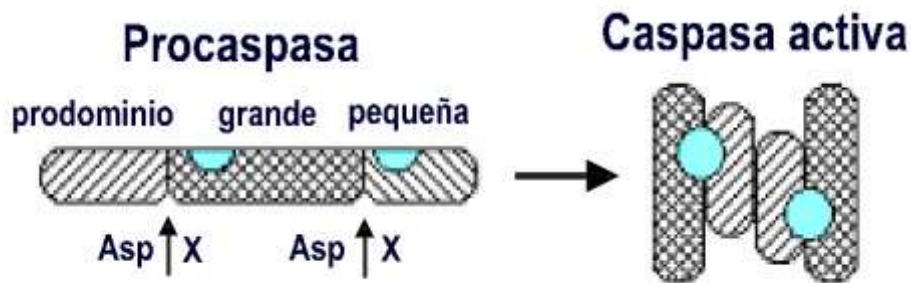


Figura 4. Modelo de activación de caspasas (Tomado de Cascales, 2003).

2.25. Ruta intrínseca de la apoptosis

La mitocondria es el punto donde convergen las distintas rutas apoptóticas, provenientes de distintos estímulos apoptóticos, y a partir de ese momento la célula “decide” si se produce o no la muerte programada, es decir a partir de aquí es un punto de no retorno. Aunque hay que destacar que no todas las rutas apoptóticas pasan por la mitocondria como es el caso de la apoptosis inducida por Fas (Perales, 2005).

La ruta intrínseca de la apoptosis se activa en respuesta a estímulos de muerte inducidos por estrés o daño celular. En la vía mitocondrial, la activación de las caspasas está relacionada con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) por proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Numerosos estímulos citotóxicos y señales proapoptóticas convergen en la mitocondria para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial. Dicha permeabilización está regulada no sólo por proteínas de la familia Bcl-2 sino también por lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo metabólico y componentes que brindan permeabilidad a los poros (Green y Reed, 1998; Fulda y Debatin, 2006; Dubin y Stoppani, 2000).

En respuesta a estímulos apoptóticos como se mencionó anteriormente, y con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, un número de proteínas normalmente encontradas en el espacio intermembranal mitocondrial son liberadas al citosol, entre ellas el citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y la endonucleasa G. Una vez liberadas al citosol, estas proteínas apoptogénicas desencadenan la muerte celular al activar las caspasas; donde la principal proteína implicada en la ruta mitocondrial de apoptosis es el citocromo C, pues tras su liberación al citosol, se induce la formación de la plataforma de activación de caspasas iniciadoras denominado apoptosoma (Fung *et al.*, 2008; Gómez, 2010). A continuación se menciona una breve descripción de todos los factores apoptogénicos que se liberan de la mitocondria tales como:

- a) Citocromo c que participa en la activación de caspasas a través de la formación del apoptosoma (cuya formación se analizará más adelante) (Van Loo *et al.*, 2002).
- b) Procaspasas-2, -3 y -9, las cuales pueden activarse una vez liberadas. Se ha descubierto que estas caspasas están nitrosiladas, pero su papel no está claro (Mannick *et al.*, 2001). Por el contrario hay investigadores que no han encontrado caspasas en la mitocondria (Van Loo *et al.*, 2002).
- c) Proteínas del choque térmico hsp10 y hsp60, las cuales facilitan la activación de caspasa-3. Sin embargo hsp70, es un factor citoprotector, capaz de unirse y neutralizar la acción de AIF (Van Loo *et al.*, 2002).
- d) Factor inductor de apoptosis (AIF). Es una flavoproteína que al liberarse de la mitocondria se transloca al núcleo donde se ha demostrado que provoca la condensación y rotura de ADN en fragmentos de alto peso molecular (50kb). Además, a nivel de membrana activa a la flipasa e inhibe a la translocasa. Esto hace que los restos de fosfatidilserina que se encuentran en células normales, en la cara interna de la membrana se expongan ahora al exterior. Y por último la actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2, pero no por los inhibidores de caspasas, es decir su acción es caspasa-independiente (Susin *et al.*, 2000).
- e) Smac/diablo (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI) es un inhibidor de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) las cuales tienen la habilidad de inhibir a las caspasas activas; por tanto Smac/Diablo previene la inactivación de las caspasas. La unión de las IAPs a caspasas y a Smac/Diablo se produce en el mismo dominio, por tanto se produce una competencia de unión. Pero además parece tener otro mecanismo de inducción apoptótica ya que aunque se suprima el dominio de unión a IAP, Smac/Diablo sigue teniendo actividad proapoptótica (Gray *et al.*, 2000).

- f) Omi/HtrA2 (Requisito de alta temperatura proteína A2/ estrés regulado de endoproteasa), es homóloga a HtrA en bacterias. Funciona también como inhibidor de IAPs, mediante la inactivación por corte, ya que se trata de una serinproteasa (Gray *et al.*, 2000). Su acción sería redundante a Smac/diablo, aunque parece que tienen localización tisular distinta. La inducción que produce es tanto dependiente como independiente de caspasas (Suzuki *et al.*, 2001).
- g) Endonucleasa G, se trasloca al núcleo tras la liberación y está involucrada en la fragmentación del ADN junto con exonucleasas y DNasa I. Esta acción al igual que AIF es caspasa-independiente (Li *et al.*, 2001).

Es importante señalar por qué la célula utiliza tantas proteínas mitocondriales como factores apoptóticos, el hecho de que estén confinados en la mitocondria y que sus sustratos estén en el citoplasma supone una garantía de que sólo van a ejercer su acción mortal si son liberados durante el proceso apoptótico. Además tiene también la ventaja de que dentro de la mitocondria ejercen otra función: el citocromo c participa en la cadena de transporte electrónico entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial; AIF al tener un dominio con actividad oxidoreductasa protege a la célula del estrés oxidativo; y Omi/HtrA2 funciona como chaperona (Green y Reed, 1998).

2.26. Papel del citocromo C: Formación del apoptosoma

Como se mencionó con anterioridad el citocromo c es liberado hacia el citoplasma, una vez ahí, junto a la molécula adaptadora Apaf-1 participa en la formación del complejo del apoptosoma, lo que resulta en el reclutamiento y procesamiento de la Procaspasa-9 hacia su forma activa (caspasa-9), en presencia de dATP (Sánchez y Arboleda, 2008). Una vez que se ha llevado a cabo la unión del citocromo c al dominio C-terminal de Apaf-1 que es una proteína con un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasa (CARD), ésta sufre un cambio conformacional desde una forma rígida a una forma flexible, de manera que se facilita la unión del dATP a sus dominios de unión. Esta unión facilita la asociación de dATP con Apaf-1 y provoca que se exponga su extremo N-terminal CARD lo que permite la formación de un complejo formado por siete moléculas de Apaf-1 que interaccionan con los extremos N-terminal CARD para reclutar pro-caspasa-9 (mediante una interacción

CARD/CARD). El apoptosoma se une a caspasa-9 en su zona central por interacción de dominios CARD, y esta unión provoca un cambio conformacional en caspasa-9 que convierte al apoptosoma en una forma activa, capaz de activar en ese momento a caspasa-3 y a caspasa-7 (Figura 6). Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la Procaspasa-9 tiene un efecto mínimo en su activación. El requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con el cofactor Apaf-1. La activación de la caspasa-9 es debida a un cambio conformacional, no a proteólisis (Fulda y Debatin, 2006; Dubin y Stoppani, 2000; Jiang y Wang, 2004).

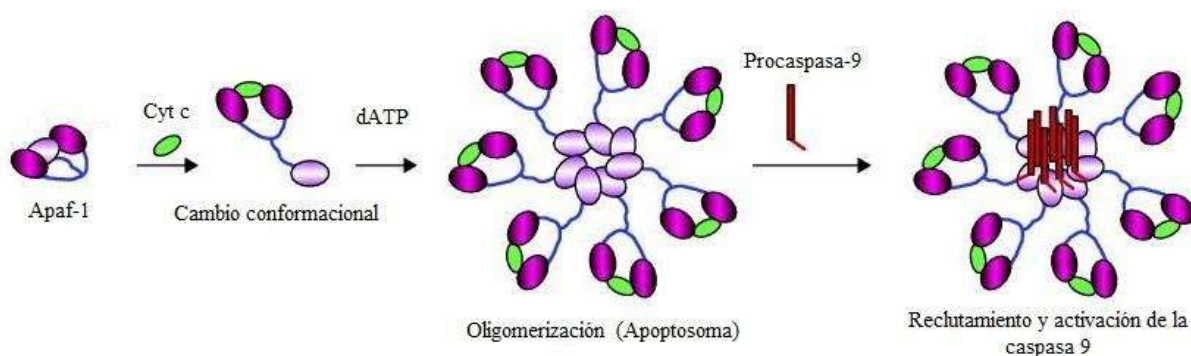


Figura 5. Formación del complejo apoptosomal durante la vía intrínseca de la apoptosis (Tomado de Gómez, 2010).

De manera consecutiva la Procaspasa-3 es reclutada hacia el apoptosoma, donde es activada por la caspasa-9. Ahora la caspasa-3 activada puede cortar diferentes sustratos en la célula para producir cambios morfológicos y bioquímicos que generen la apoptosis (Ghobrial, *et al.*, 2005; Fan, *et al.*, 2005; Green y Reed, 1998).

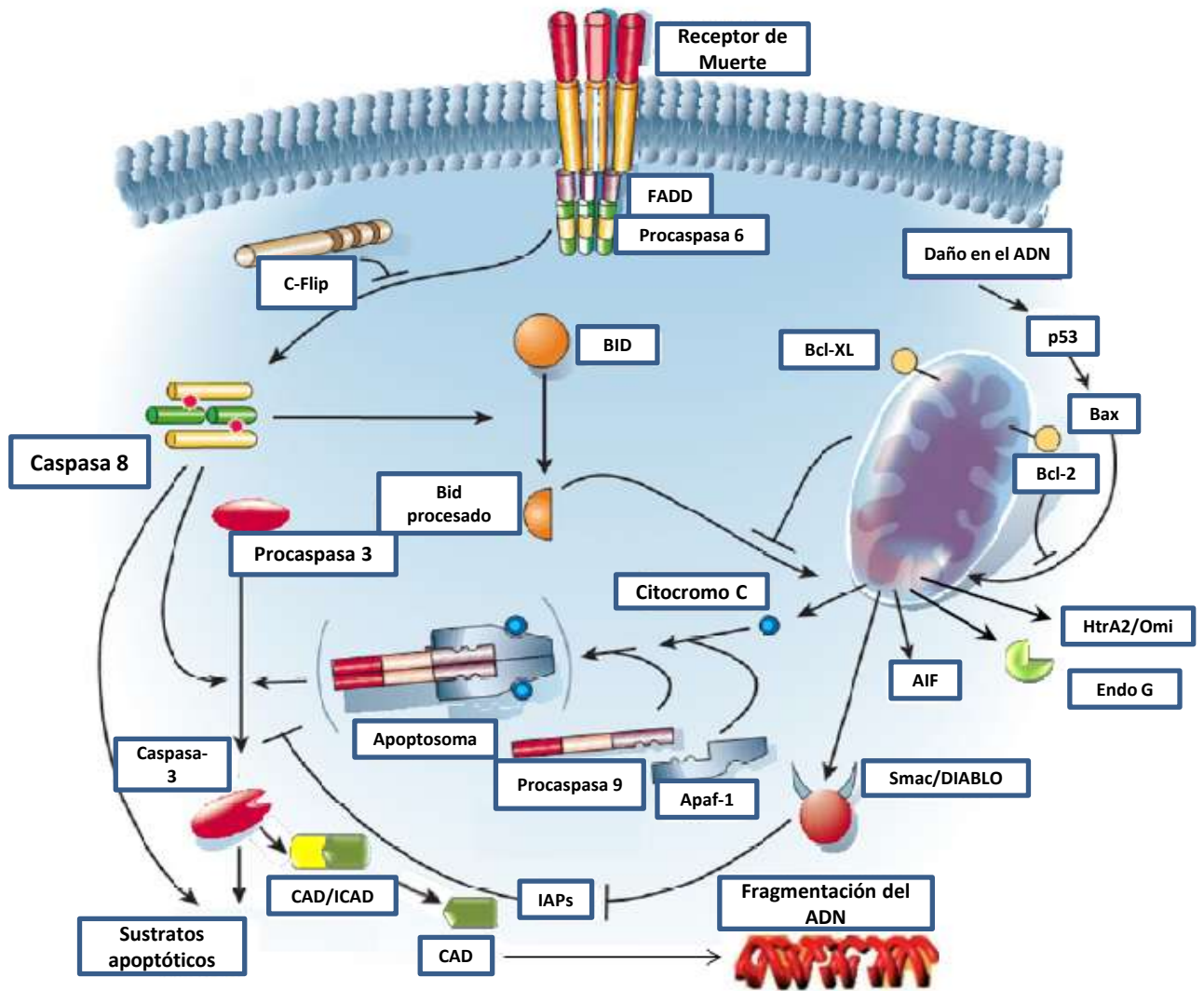


Figura 6. Vías de señalización apoptótica: Ruta extrínseca de la apoptosis e intrínseca. (Tomado y modificado de Hengartner, 2000).

2.27. Ruta extrínseca de la apoptosis

Ruta extrínseca o de receptores de muerte se activa por la unión de diferentes ligandos a sus receptores en la membrana plasmática. A los receptores responsables de transmitir la señal de apoptosis al interior de la célula se les denomina receptores de muerte y pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Bodmer *et al.*, 2002).

Los receptores de muerte forman un subgrupo de la superfamilia TNF que incluye más de 20 proteínas con funciones como: regulación de muerte celular, diferenciación o regulación del sistema inmune. En humanos se han descrito seis receptores de muerte que son CD95 (Fas, APO-1), TNFR1 (p55, CD120Aa), TRAMP (APO-3, DR3, WSL-1, LARD), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5, APO-2, KILLER, TRICK2) y DR6 (TR-7). Los receptores de muerte son proteínas transmembrana de tipo I, que intracelularmente, contienen un dominio de interacción con otras proteínas, denominados dominio de muerte (DD) de unos 80 aminoácidos. Este dominio es fundamental para la transmisión del impulso apoptótico y la transmisión de las señales apoptóticas desde la superficie celular hacia el interior de la célula, además sirve de anclaje a una serie de proteínas señalizadoras que también poseen un dominio de muerte (DD) (Fulda y Debatin, 2006; Ghobrial, *et al.*, 2005; Bodmer *et al.*, 2002).

Cuando el ligando se une, los receptores de muerte interactúan a través de sus dominios de muerte con los correspondientes dominios proteicos de moléculas adaptadoras como FADD (Dominio de muerte asociado a Fas). Estas moléculas adaptadoras también contienen un segundo dominio de interacción proteico, denominado DED en el extremo N-terminal el cual facilita su unión al prodominio DED de la Procaspasa-8. Estos componentes forman el complejo de inducción de muerte (DISC) (Figura 8), el cual activa a la caspasa 8 a través de un mecanismo de dimerización inducido por proximidad. En este punto, una alta concentración de la caspasa 8 dimerizada promueve su propia activación (autocatalítica) y la subsecuente activación de las proteínas efectoras (Ghobrial, *et al.*, 2005; Shi, 2004).

La caspasa-8 activa, rompe varias proteínas de la célula incluyendo la Procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular.

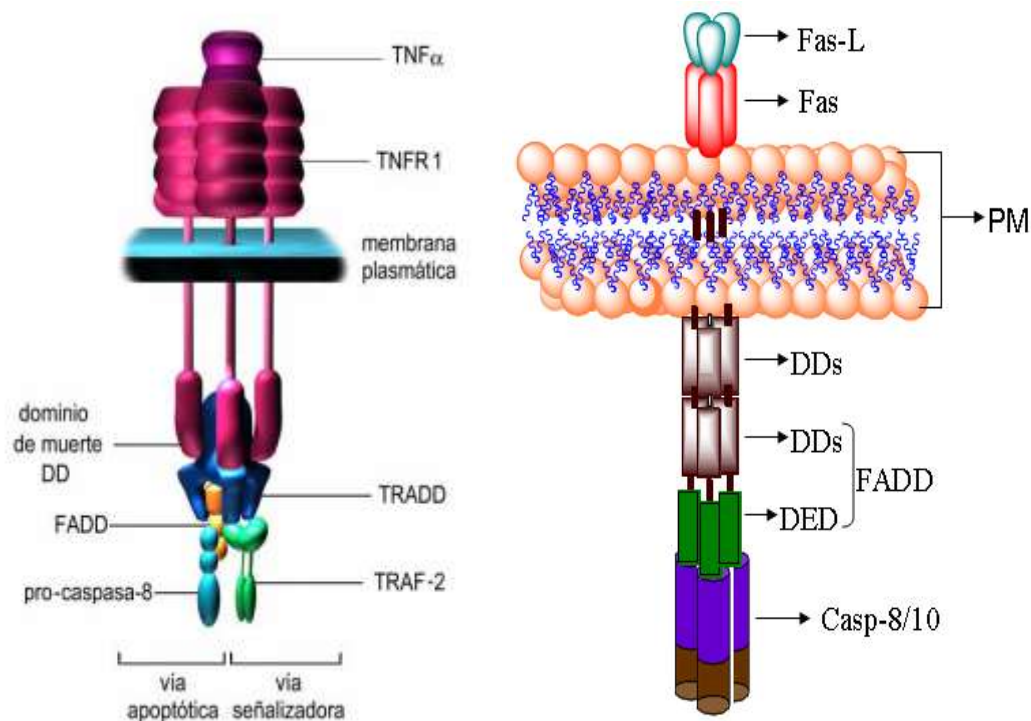


Figura 7. Vías de señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis, donde se muestran las rutas de ambos ligandos de muerte. (Tomado de Cascales, 2003 y Rajesh *et al.*, 2009).

2.28. Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca

Las vías extrínseca e intrínseca del proceso de apoptosis están conectadas entre sí por la proteína “solo Bcl-2 “solo BH3”, BID (Danial y Korsmeyer, 2004). La activación de los receptores de muerte induce la formación del DISC y la activación de la caspasa-8 que, entre otros efectos, proteoliza a Bid, dando lugar a su forma truncada, tBid, que es capaz de translocarse a la membrana mitocondrial externa y junto con Bax y Bak inducir la liberación de citocromo c al citosol y la consecuente activación de caspasa-9 en el apoptosoma, lo que provocaría más activación de caspasas efectoras (3,6 y 7); donde el corte de la proteína Bid provoca la activación de la vía mitocondrial (Dubin y Stoppani, 2000; Cascales, 2003).

La activación de la ruta intrínseca depende del tipo celular y se ha determinado que las células se clasifiquen en células Tipo I, en las que la activación de caspasa-8 en el DISC es suficiente para activar directamente a las caspasas efectoras, o células Tipo II, en las que la activación inicial de la caspasa-8 en el DISC no es suficiente para activar a las caspasas efectoras y requiere de la vía mitocondrial para ello, o bien los niveles de IAPs en estas células son tan altos que no permiten la activación de las caspasas efectoras tras la activación de la caspasa-8 en el DISC y requieren de los factores mitocondriales necesarios para inhibir la función de los IAPs (Smac/Diablo) (Cascales, 2003; Marcé, 2006).

2.29. Principales nucleasas implicadas en la degradación del ADN durante el proceso apoptótico

2.30. CAD (endonucleasa activada por caspasa)

La degradación del ADN cromosomal en unidades nucleosomales produce el patrón de “cromatina en escalera” que es un marcador bioquímico prominente de células apoptóticas; dicha degradación del ADN es uno de los pasos finales más importantes de la apoptosis (Wyllie, 1980). Como hemos mencionado, la degradación del ADN es uno de los procesos celulares que habitualmente caracterizan la muerte por apoptosis. Actualmente, se conocen dos nucleasas principales que están implicadas en dicha degradación: CAD y EndoG.

En 1980, Wyllie observó que el tratamiento de timocitos de rata con glucocorticoides induce una degradación del ADN genómico en fragmentos nucleosomales de doble cadena (Wyllie, 1980). Desde entonces muchos grupos trataron de buscar a la nucleasa responsable de esta actividad. Fue después del descubrimiento de las caspasas cuando Liu *et al.* (1997) observaron que al tratar extractos citosólicos de células en proliferación con caspasas, éstos podían inducir fragmentación del ADN en núcleos aislados (Liu *et al.*, 1997). El factor responsable de esta actividad fue designado como DFF (factor de fragmentación del ADN), y posteriormente pasaría a recibir el nombre de CAD (ADNasa activada por caspasas ó endonucleasa activada por caspasa) que es una endonucleasa específica de doble cadena, la cual es la responsable del rompimiento de los espacios nucleosomales y la subsecuente condensación de la cromatina durante la apoptosis (Eui-Jeon *et al.*, 2004). CAD forma un complejo con ICAD, su inhibidor, que existe en dos variantes alternativas: la forma larga

ICAD-L (conocida como DFF45) y la forma corta ICAD-S (DFF35) (Eui-Jeon *et al.*, 2004) la cual debe ser procesada por la caspasa-3 para que CAD se active (ver figura 9). Con el fin de digerir el ADN durante el proceso apoptótico, CAD debe dirigirse al núcleo y para ello cuenta con la presencia de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal; sin embargo, en condiciones normales de proliferación existen resultados contradictorios acerca de su localización, habiéndose detectado la presencia de CAD/ICAD tanto en el citosol como en el núcleo dependiendo del tipo de célula observada (Liu *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 2003).

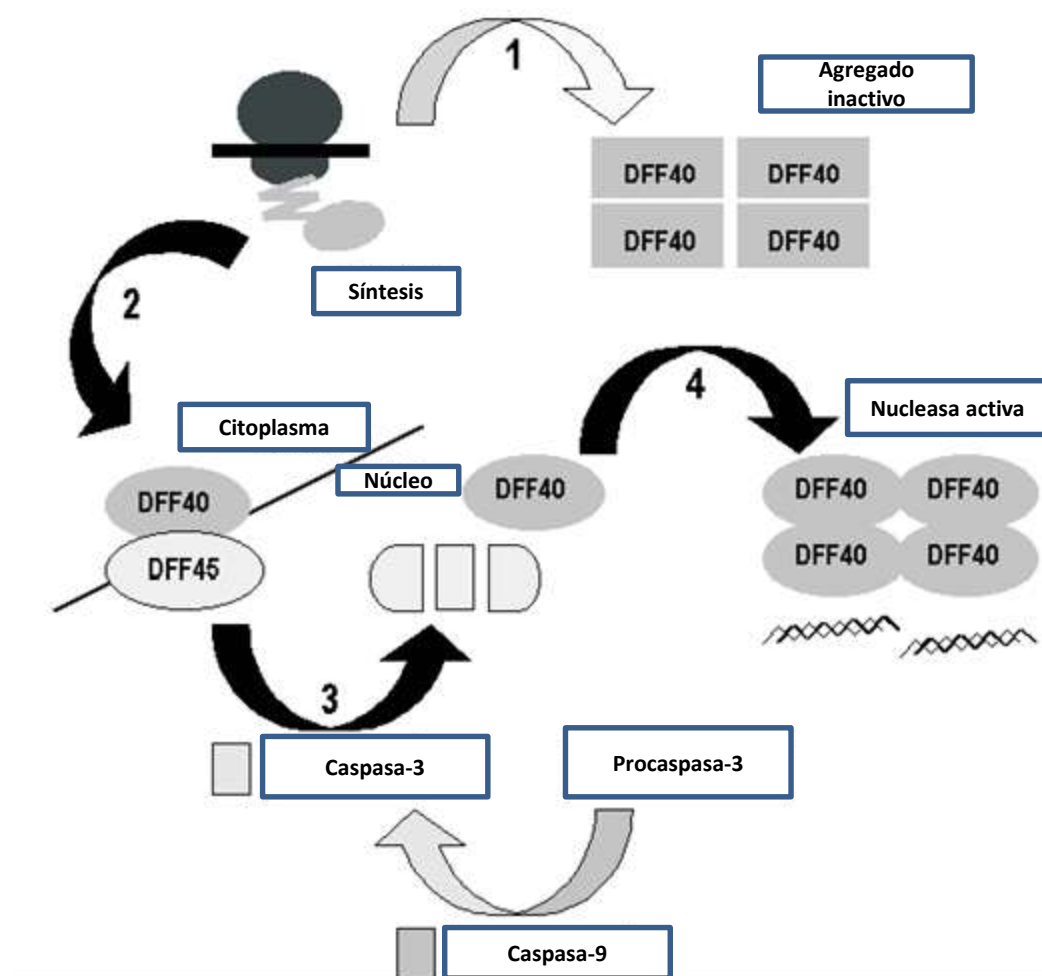


Figura 8. Modelo de síntesis de DFF40 en el citoplasma y DFF45 unido a la cadena naciente (Tomado y modificado de Widlak, 2000).

Como se ha mencionado anteriormente la principal proteína involucrada en la fragmentación del ADN es el factor de fragmentación (DFF), el cual está compuesto por subunidades de 40 y 45-kDa llamadas DFF40 y DFF45 los cuales median la degradación del ADN genómico en fragmentos nucleosomales. Ambos están codificados por genes que aún no están caracterizados (Liu *et al.*, 1998).

En su forma inactiva, DFF es un heterodímero compuesto por subunidades de 40 y 45 kDa, denominada DFF40/CAD/CPAN y DFF45/ICAD. En el humano DFF40 es una proteína compuesta de 345 aminoácidos, mientras que DFF45 es una proteína compuesta de 331 aminoácidos. DFF45 lleva dos sitios de reconocimiento de caspasa-3 (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998). DFF40 y DFF45 no tienen homología global aparente, pero si tienen un dominio conservado de 80 aminoácidos en su extremo N-terminal; este dominio se ha encontrado en varias proteínas llamadas CIDES, y se ha denominado dominio CIDE-N (Inohara, 1998; Inohara *et al.*, 1999).

El extremo C-terminal de DFF40 funciona como una señal de localización nuclear, DFF40 es una subunidad catalítica mientras DFF45 es una subunidad reguladora del DFF. Los dominios CIDE-N están implicados en interacciones DFF40/DFF45 (Lugovskoy *et al.*, 1999; Otomo *et al.*, 2000), y la eliminación de los residuos C-terminales de DFF40 dan como resultado la pérdida completa de la actividad enzimática, lo que sugiere que el extremo C-terminal contiene el dominio catalítico de la nucleasa (Inohara *et al.*, 1999). DFF45 no solo puede ser cortada por la caspasa-3, también puede ser cortada por la caspasa-7 y la gransyma B aunque con menor eficacia que la caspasa-3 (Widlak, 2000). DFF45 juega un doble papel como chaperona inhibidora de DFF40, pues se ha demostrado que la expresión de DFF40 en varios sistemas en la ausencia de DFF45 co-expresada resulta en la generación de agregados inactivos de DFF40, lo que sugiere que DFF45 es requerida para el apropiado doblamiento de DFF40 activo durante su síntesis (Widlak, 2000).

DFF40 ataca la cromatina en las uniones internucleosomales del ADN, generando fragmentos mono y oligonucleosomales, de esta manera DFF genera el patrón en forma de escalones en el ADN. Cuando DFF es activado la fragmentación del ADN da inicio con fragmentos cerca de 50 kb, los cuales preceden a los fragmentos oligonucleosomales que tienen un tamaño de 0.2 kb y que dan lugar al patrón en escalera (Widlak, 2000).

Se sabe que DFF40/CAD presenta una extraordinaria preferencia para escindir en las regiones internucleosomales. Esta preferencia se debe a la estructura similar a unas tijeras del sitio activo DFF40/CAD. Se sabe que esta preferencia por el ADN enlazador, se mejora considerablemente cuando se lleva a cabo la unión de la histona H1 a la enzima. Además la unión y activación de DFF40/CAD por la topoisomerasa II puede ser la responsable de la orientación en el corte de 50 a 300 kb en los eventos de escisión de dominios de bucle cromosómico (ver figura 10) que ocurren durante la fragmentación cromosómica en células apoptóticas (Widlak, 2000; Widlak y Garrard, 2005).

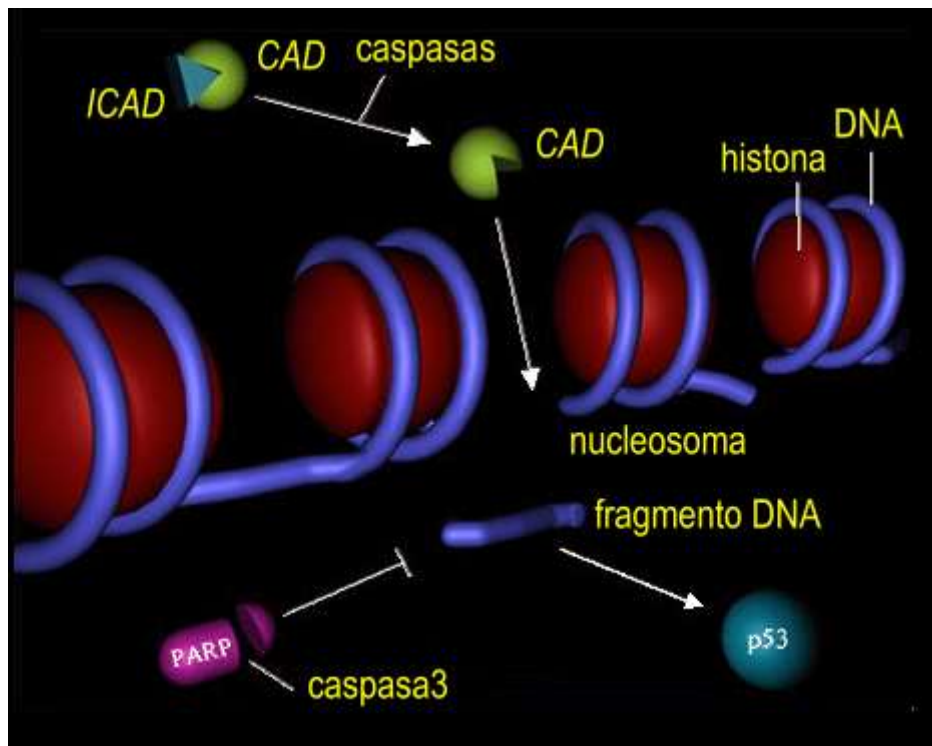


Figura 9. Proceso de degradación del ADN mediado por la endonucleasa CAD (tomado de Cascales, 2003).

En conclusión, la fragmentación del ADN es el resultado de la degradación de la cromatina, mediado por endonucleasas, en los sitios internucleosomales y se acompaña típicamente de la condensación de la cromatina. Este acto ciertamente se opone a cualquier posibilidad futura de división celular, pero su propósito real es hacer que la cromatina sea más manejable para su posterior eliminación por las células fagocíticas. Una falla en la degradación del ADN de las células apoptóticas resulta en la activación del sistema inmune innato, conduciendo a un desarrollo tímico defectivo. Esto sugiere que la degradación del ADN asociado con la apoptosis ayuda a prevenir la acumulación de ADN que es liberado al espacio extracelular, y que podría provocar una respuesta autoinmune. En realidad, anticuerpos anti-ADN son recurrentemente identificados en diversas condiciones autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico. Las células que son deficientes en endonucleasas activadas por caspasas (CAD), exhiben durante la apoptosis una menor degradación del ADN celular autónomo y una menor condensación de la cromatina, lo cual implica un importante rol para estas enzimas (Rojas *et al.*, 2009).

2.31. EndoG

En 1994, Gerschenson *et al.* (1995) demostraron que la nucleasa conocida como endonucleasa G (EndoG) observada en el núcleo de células de mamífero era la misma nucleasa que había sido descrita como la “ADNasa principal de la mitocondria”. Estas demostraciones están basadas tanto en la identidad de secuencia entre ambas, como en sus propiedades bioquímicas y especificidad a la hora de atacar una secuencia de nucleótidos (Gerschenson *et al.*, 1995). En 2001, Li *et al* demostraron que EndoG es capaz de inducir fragmentación nucleosomal del ADN bajo un estímulo apoptótico mediante su translocación desde la mitocondria hasta el núcleo en fibroblastos de ratones transgénicos que carecen de CAD (o bien del sitio de procesamiento de ICAD mediante el cual CAD es activada por la caspasa-3 (Parrish *et al.*, 2001).

EndoG ha sido identificada en todos los genomas completos que existen de eucariotas, incluyendo *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis. elegans* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros. Pero también nucleasas pertenecientes a bacterias como *Serratia marcescens* y *Anabaena* sp.,

contienen un gen codificante para una nucleasa que muestra un 42 y un 28% de identidad respectivamente con la secuencia de la EndoG bovina, lo cual apoya la teoría endosimbionte del origen de la mitocondria (Low, 2003).

La endonucleasa EndoG es una de la nucleasas más conocidas y mejor conservadas del reino eucariota, y que se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria, esta endonucleasa representa una vía apoptótica caspasa-independiente (Wang, 2001; Li *et al.*, 2001; Van Gurp *et al.*, 2003). Al igual que otras proteínas mitocondriales, esta nucleasa esta codificada por un gen nuclear y presenta en su secuencia una región que codifica para un péptido señal en su extremo amino terminal, que es responsable de su localización (Cote y Ruiz Carrillo, 1993; Ohsato *et al.*, 2002). El hecho de que esta nucleasa esté contenida en la mitocondria es muy importante, pues la expresión ectópica extra-mitocondrial de EndoG activa puede inducir la muerte celular (Schafer *et al.*, 2004). Como se ha demostrado ya hace algunos años, la localización de la proteína cambia durante el proceso apoptótico, y EndoG se transloca de la mitocondria al núcleo para ejercer su acción degradativa sobre el ADN genómico (Li *et al.*, 2001), por lo cual esta endonucleasa tiene al igual que CAD un inhibidor llamado EndoGI, el cual consiste en una proteína con dos dominios que se unen a los sitios activos de cada uno de los monómeros que forman EndoG, quedando ésta englobada en su interior, a modo de sandwich. EndoGI se localiza en el núcleo y se ha sugerido que podría actuar como un “seguro de vida” en caso de que parte de EndoG pudiese quedar en el núcleo por un fallo en el sistema de transporte a la mitocondria (Loll *et al.*, 2009). Una vez liberada, EndoG es capaz de inducir la fragmentación de ADN nucleosomal. A diferencia de DFF40/CAD, la bien caracterizada nucleasa apoptótica cuya activación requiere la escisión de la chaperona inhibidora DFF45/ICAD por la caspasa-3; EndoG tiene actividad independiente de la activación de caspasas (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la actividad de EndoG puede ser responsable de la fragmentación de ADN a gran escala observada en células deficientes de DFF45 después de la inducción de la apoptosis por la irradiación UV y otros factores inductores de apoptosis (Wang, 2001).

EndoG pertenece a la súper-familia de las nucleasas no específicas con motivo $\beta\beta\alpha$ de unión al metal (Huang *et al.*, 2006), las cuales se encuentran en un amplio número de organismos tanto procariotas como eucariotas; esta familia de nucleasas se caracteriza por presentar un motivo DRGH que contiene diversos residuos importantes para la catálisis y entre los cuales destaca la histidina, que se comporta como una base general activando una de las aguas que hidratan al catión metálico situado en el centro activo, llevándose así a cabo el ataque nucleofilo sobre el átomo de fósforo del ADN (Schafer *et al.*, 2004). Al igual que otros componentes de la familia de nucleasas no específicas con motivo $\beta\beta\alpha$ de unión al metal, EndoG es activa tanto frente a ARN, como frente a híbridos de ADN/ARN, y frente a ADN de cadena doble y sencilla, con preferencia por este último. Con ADN de doble cadena como sustrato, EndoG genera primero cortes de cadena sencilla (Gerschenson *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente EndoG está codificada por un gen nuclear, traducido en el citosol, (Van Gurp *et al.*, 2003) y se ha propuesto que participa en la replicación mitocondrial mediante la eliminación de cebadores de ARN para la iniciación de la síntesis de ADN mitocondrial; la función propuesta de EndoG en la replicación del ADN mitocondrial se basa en su ubicación y especificidad de sustrato, pues EndoG prefiere sustratos ricos en GC, que se asemejan a las secuencias de ADN en el origen de replicación del ADN mitocondrial (Cote *et al.*, 1993).

Lo anteriormente descrito, recalca la importancia de la correcta acción de estas endonucleasas, principalmente CAD, pues esta endonucleasa es una de las principales responsables de darle la característica prominente a este tipo de muerte celular (apoptosis), y con ello convertirla en la principal herramienta a identificar por los investigadores relacionados a este tema. A continuación se describen algunas de las técnicas más usadas para la identificación de muerte celular por apoptosis, entre las cuales se incluye la identificación de la fragmentación del ADN, el cual es el marcador bioquímico prominente para la identificación de la muerte celular por apoptosis.

2.32. Métodos utilizados para la detección de apoptosis

La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de tratamientos, etc. A continuación se mencionan algunos de los procesos comúnmente utilizados para detectar apoptosis.

- a) ***Evaluación de la simetría de la membrana celular.*** Una de las primeras manifestaciones de la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. Es bien sabido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su simetría. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidilserina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular (Alfaro *et al.*, 2000).
- b) ***Cambios morfológicos presentes en la muerte celular por apoptosis.*** Otra de las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular por apoptosis es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como lo son las microvellosidades. Al mismo tiempo se observan cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de condensación de la cromatina (Alfaro *et al.*, 2000).
- c) ***Caspasas.*** La activación de la caspasa-3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis. Este tipo de marcadores es de gran importancia, ya que la detección de apoptosis *in vivo* por métodos que detectan la degradación de ADN, no siempre es exitosa, ya que estas células pueden ser removidas antes de que dicha degradación se presente. La determinación de la activación de la caspasa-3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis, aunque en este nivel, el proceso de apoptosis aún puede ser reversible (Huerta *et al.*, 2007).

d) **Fragmentación de ADN:**

Tunel (del inglés: Terminal dUTP Nick End-Labeling); es una metodología implementada para determinar los fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas, marcándolos colorimétrica o fluorescentemente mediante un proceso enzimático, y visualizándolos en microscopio de luz, de fluorescencia o citómetro de flujo. Este método es rápido, pero costoso y poco sensible, pues se han reportado que puede registrar falsos positivos de células necróticas y células en proceso de reparación de genes (Salazar, 2009).

Escalera de la muerte; esta es la característica más contundente de indicio de muerte por apoptosis, y por ello uno de los procesos más utilizados para la detección de la misma (Alfaro *et al.*, 2000). La fragmentación de ADN se lleva a cabo de forma específica entre nucleosomas; es sabido que durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases (pb). Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de ADN de células apoptóticas, es posible observar la aparición de un patrón característico de ADN en escalera, el cual contiene fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera (Huerta *et al.*, 2007; Salazar, 2009; Alfaro *et al.*, 2000). Cabe señalar que la identificación de la fragmentación del ADN por medio de “escalera de la muerte” es considerada como la técnica por excelencia para la detección de apoptosis (Taylor *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2012), dado que el proceso apoptótico tiene la capacidad de ser reversible, siempre y cuando éste no llegue a el punto donde el ADN es fragmentado, un punto de no retorno, por tanto evidencia definitiva de muerte por apoptosis (Tang *et al.*, 2009).

2.33. Las plantas como fuente de principios activos

Actualmente, existen en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) 141 medicamentos contra el cáncer y aproximadamente el 67 % de éstos son de origen natural (Cragg *et al.*, 2005). Estos medicamentos se han clasificado como; productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Cragg *et al.*, 2005). Se consideran como productos naturales a los producidos por bacterias (bleomicina), a los materiales obtenidos de organismos marinos y de plantas (Cragg *et al.*, 2005).

La necesidad de promover la búsqueda de medicamentos de origen natural, surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos mortales como el cáncer. Esta enfermedad es una de las que más se ha extendido en el panorama epidemiológico mundial desde finales del siglo veinte, convirtiéndose en un grave problema de salud pública, no sólo por sus manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo con los que se asocia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial. En México, el cáncer ocupa desde 2006, el tercer lugar como causa de muerte, cada año ocurren 61 mil decesos y se diagnostican 100 mil nuevos casos. Para el 2001, dicha enfermedad, correspondió a la pérdida de 33.5 años potenciales de vida (INEGI, 2010).

En términos de tratamiento del cáncer, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos (Setzer y Setzer, 2003), por la formación de nuevas clonas, debido a su inestabilidad genética (Vega-Ávila *et al.*, 2006). Por ello, los compuestos fitoquímicos han sido investigados, proporcionando nuevos recursos para la industria quimioterapéutica (Cordell *et al.*, 1993; Mans *et al.*, 2000). En este contexto surge la necesidad de obtener nuevos principios activos de origen natural que amplíen las opciones farmacológicas y que puedan formar parte de medicamentos alternativos, a partir de la diversidad local (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005).

La diversidad de los seres vivos surge básicamente como una consecuencia del proceso de especiación, el cual consiste en la formación de una o más especies diferentes a partir de otra ancestral (Grant, 1989), ya que cierto aislamiento reproductivo induce variaciones genéticas y provoca a su vez variaciones morfológicas, fisiológicas y químicas (Futuyma, 1988; Luna, 2001). Rzedowski (1993) menciona a México como centro de origen y domesticación de diferentes especies cultivadas con una gran cantidad de razas, muchas de ellas semidomesticadas y abundancia de parientes silvestres (Rzedowski, 1995). Una de las familias botánicas importantes en las culturas mesoamericanas por la diversidad de especies incluidas en la dieta y medicina por presentar numerosos metabolitos secundarios con potencial farmacológico, son las cucurbitáceas (Ortega-Paczka *et al.*, 1998), mismos que han sido usados en diferentes aspectos de la salud humana. La mayoría de éstos, se caracterizan por su sabor amargo, por lo que constituye una defensa contra la herbivoría de insectos y microorganismos tales como, hongos, bacterias, virus y una de estas especies son los chayote (*Sechium* spp.) originarios de mesoamérica y México como uno de los centros de mayor diversidad biológica (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005).

2.34. Extractos de plantas como alternativas antineoplásicas

En la actualidad se ha incrementado la necesidad de fortalecer las investigaciones de tratamientos alternativos o complementarios, con el fin de mitigar los efectos secundarios y alcanzar mayores niveles de especificidad y eficacia para el tratamiento del cáncer. A este respecto, los productos naturales son utilizados por el hombre para la obtención de agentes medicinales (Setzer y Setzer, 2003).

El valor medicinal de las plantas está dado por sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios, que producen efectos fisiológicos y que en la naturaleza tienen la función de defensa química contra la herbivoría, los cuales a menudo muestran una gran complejidad estructural que puede determinar su actividad biológica, dichos compuestos son obtenidos de las plantas por destilación o extracción con disolventes orgánicos; representando un enorme recurso científico y clínico para el desarrollo de nuevos fármacos (Rivera, 2011).

Dentro de las plantas poco estudiadas se encuentran las especies del género *Sechium* spp., de la familia Cucurbitaceae, llamados comúnmente “chayotes” (Ortega- Paczka *et al.*, 1998). Por muchos años se pensó que *Sechium* spp., era un género monotípico, cuya única especie era *Sechium edule* (Jacq.) Sw., recientemente se acepta que dentro del género hay diez especies, ocho silvestres (*S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*) y dos cultivadas (*S. edule* y *S. tacaco*) con distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996). Recientemente se han clasificado diez grupos varietales, con base en caracteres morfoestructurales, fisiológicos, químicos y genéticos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). Debido a que en la naturaleza ocurren hibridaciones, recientemente el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISEM), detectó el linaje genético del híbrido H-387-07-GISEM producto de los cruzamientos entre las variedades: *Sechium edule* var. *virens levis* por *Sechium edule* var. *amarus silvestrys* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (GISEM, 2008).

Estudios realizados en *Sechium edule* (Jacq.) Sw. se identificaron compuestos como peroxidases, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides y cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, anti-oxidantes, antiviral y efectos antitumorales (Salama *et al.*, 1986; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2004).

2.35. Origen del género *Sechium* spp.

A diferencia de lo que ocurre con otras especies cultivadas, en *Sechium* spp., no existen evidencias arqueológicas o relictos que ayuden a precisar la antigüedad de su origen y manejo. La testa suave de la semilla y su fruto carnoso no permiten su conservación (Lira, 1995 citado por Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). La mayor evidencia de su origen es la existencia de chayotes silvestres en la región centro y sur de México y Centro América. Se considera que el término moderno chayote es una modificación de los vocablos Náhuatl “*huitz ayotl*”, “*chayotl*”, “*chayotli*” lo cual, confirmaría su uso desde tiempos precolombinos (Cook, 1901).

La importancia del género *Sechium* (P. Br.), se ha sustentado en que las especies *Sechium edule* (Jacq.) Sw. y *Sechium tacaco* (Pitt.) C. Jeffrey son de importancia alimenticia, ya que los frutos de ambas especies y la raíz de la primera, formaron parte de la dieta de culturas precolombinas (Hernández, 1985; Lira-Saade, 1996). El naturalista europeo Francisco Hernández, quien vivió en México durante el período comprendido entre los siglos XV y XVI (Cook, 1901), fue uno de los primeros en informar sobre la existencia del chayote, y preparó voluminosas descripciones sobre la Nueva España, su pueblo e historia natural. En estos tratados que fueron publicados en Roma en 1651, incluyó plantas medicinales y comestibles. Sin embargo, la nota acerca del chayote fue omitida, siendo hasta la edición de 1790, fecha en que los trabajos de Hernández se completaron en una segunda edición, que el chayote fue mencionado. El abate Francisco Xavier Clavijero en su tratado sobre la historia antigua de México (Clavijero, 1853), describió al chayote como: “*Una fruta redonda y semejante en el erizo de que está cubierta, a la castaña; pero mucho más grande y de un color verde más oscuro. Su carne es blanca, que tira a verde, y en el medio tiene una pepita grande y blanca, semejante a la carne en la sustancia. Se come cocido juntamente con la pepita. Esta fruta se da en una planta enredadera y vivaz, cuya raíz es buena para comerse.*”

El género *Sechium* spp., se encuentran diez especies, ocho silvestres: *S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, *S. vilosum*) y dos cultivadas *S. tacaco* y *S. edule* con una distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996).

La especie *S. edule* presentan amplia variación morfológica, sobre todo en los tipos introducidos al cultivo. En México se ha identificado la mayor variación de esta especie (Xal, 2001), tanto para cultivados como para silvestres. Las colectas realizadas por Cadena (2001), en dicha región, han mostrado plantas con rasgos morfológicos diferentes principalmente en el tamaño de los frutos, color, forma, sabor amargo y ligeramente dulce, así como también, plantas que presentan polimorfismo en hojas, con diferente coloración en pecíolo, venación y guías.

Otra especie de este género es *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., es una planta endémica de una pequeña región de México, en el norte de Oaxaca, cerca de Veracruz denominada la Chinantla, se encuentra en áreas con alta humedad y altitudes desde 20 a 800 metros; es conocido como: cabeza de chango, chayote cimarrón y chayote de monte (Lira-Saade, 1996). De igual forma, la especie *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., se encuentra en algunas partes del sureste de Chiapas y Guatemala, en un rango de altitud que va de 50-2100 m, frecuentemente crecen en plantaciones de café, y es conocido como: chayote de caballo (Lira-Saade, 1996).

Estudios realizados con frutos, hojas y semillas de chayote han revelado su actividad diurética, anti-inflamatoria (Salama *et al.*, 1986) e hipotensora (Cambar *et al.*, 1980; Guppy *et al.*, 2000), antimutagénica (Yen *et al.*, 2001), antibacteriana, ayuda a la eliminación de cálculos renales, es utilizado como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour *et al.*, 2002), alivia la inflamación intestinal y cutánea además de favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que *Sechium edule* (Jacq.) Sw contiene peroxidasas, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides y cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, antioxidantes, antiviral y efectos antitumorales (Salama *et al.*, 1986; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer y Setzer, 2003; Siciliano *et al.*, 2004), incluso Wu *et al.*, 2009, caracterizaron a la proteína *sechiumina* del extracto acuoso de la semilla, la cual tiene propiedades de inactivación ribosomal y podría ser un posible agente quimioterapéutico.

2.36. Antecedentes directos

En el laboratorio de hematopoyesis y leucemia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se han realizado estudios con extractos crudos obtenidos de los frutos de ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. que inhibieron la proliferación de las líneas cancerígenas de ratón P388 (leucemia mieloide) pero sólo algunas lo hicieron sobre L-929 (fibrosarcoma de pulmón) (Salas y Torres, 2007). Además se demostró que extractos crudos de frutos de *S. chinantlense* CE, *S. compositum* y el híbrido H-387-07-GISem inhiben la proliferación en forma dosis-dependiente de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774. Este hecho sumado a que *Sechium edule* (Jacq.) Sw., inhibe la proliferación de líneas de células leucémicas de ratón indicaba que este género podía compartir fitoquímicos con potencial antitumoral. Para probar esto se realizaron estudios de potencial antitumoral de cada extracto, reflejada en su IC₅₀, se comparó con la IC₅₀ mayor a 400 µg·ml⁻¹ de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en P388 y se concluyó que en el peor de los casos para P388, por lo menos era 150 veces más potente que los provenientes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Obtenida la IC₅₀ de los extractos para cada línea celular, se realizaron estudios para observar el efectos de éstas sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón, y revelaron que la proliferación se redujo en menos del 50% con respecto a los controles, pero la viabilidad celular fue cercana al 100 %, aunado a estos resultados se observó que la IC₅₀ de P388 que fue usada sobre la misma línea celular, redujo en forma significativa su viabilidad celular, concentración que siempre fue mayor para J774, lo cual sugiere una posible selectividad de la actividad citotóxica para las células tumorales. El decremento observado en la viabilidad se explicó por la activación de apoptosis, pues se observó que después del uso de las IC₅₀ para cada extracto y línea celular, sobre las mismas líneas celulares, se encontró que P388 y J774 mostraron evidentes cambios morfológicos como aumento del volumen celular, modificación en el tamaño citoplasma-núcleo, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación en algunas células, fragmentación nuclear con membrana celular intacta y formación de cuerpos apoptóticos, además de que la evaluación del porcentaje de cuerpo apoptóticos mostró un aumento significativo en presencia de extractos de *Sechium* spp., en comparación con los controles (Tiburcio, 2011). Por todo lo anterior se sugiere que los extractos de *Sechium* spp., culminan en la inducción de

apoptosis, por ello en este trabajo se analiza si los extractos inducen fragmentación de ADN, una prueba contundente de muerte celular por apoptosis (Guimaraes *et al.*, 2012).

2.37. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz y extractos crudos de las especies silvestres, *Sechium chinantlense* Lira & Chiang; *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeff; y el híbrido H-387-07-GISem inhiben la proliferación en forma dosis-dependiente de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774, además de provocar cambios morfológicos importantes e inducir la formación de cuerpos apoptóticos, pero no se sabe si los extractos inducen degradación del ADN en forma de escalera de la muerte.

3. Justificación

El cáncer es una enfermedad que se considera la primera causa de muerte a nivel mundial. En México ocurren 63,000 muertes ocasionadas por el cáncer de los cuales el 12.8 % es provocado por algún tipo de leucemia, siendo este tipo de cáncer el más frecuente en niños y la segunda causa de muerte en infantes mexicanos, en cuanto a las personas adultas con una edad media de 60 años, la leucemia se diagnostica en cada 4/100 000 habitantes, y en el grupo de edad mayor de 65 años o denominado paciente viejo, la incidencia se incrementa hasta en 15/100 000 habitantes (Montaño-Figueroa *et al.*, 2010); las terapias existentes para tratar a la leucemia son tóxicas para el paciente deteriorando su calidad de vida, además de que las células cancerígenas generan resistencia a los agentes anticancerígenos. Por lo cual existe una creciente necesidad de buscar nuevos fármacos de origen vegetal, que tengan una mayor especificidad, sean menos agresivos con la salud del paciente, así como un menor costo económico. Por ello, los compuestos fitoquímicos han sido investigados, proporcionando nuevas opciones para la industria farmacéutica (Cordell *et al.*, 1993; Mans *et al.*, 2000). Actualmente el 60 % de los medicamentos anticancerígenos provienen de fuentes naturales (Cragg *et al.*, 2005). Debido a esto se ha incrementado el estudio de extractos vegetales. El género *Sechium* spp., en particular, ha sido poco estudiado en cuanto a su potencial anti-tumoral, aunque estudios recientes han demostrado que ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., y extractos crudos de las especies silvestres, tienen una actividad antiproliferativa, anti-leucémica y muy probablemente vía apoptótica; por lo cual si se demuestra lo último, sería una prueba contundente de que los extractos de las especies silvestres del género *Sechium* spp., pueden ayudar a ofrecer una posible nueva opción para resolver un problema de salud en México y el mundo, como lo es el cáncer y además establecer una nueva línea de investigación con aplicación biomédica de las especies endémicas de México.

4. Hipótesis

Los extractos crudos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Jacq.) Sw., y las especies silvestres, *Sechium chinantlense* Lira & Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeff., y el híbrido H-387-07-GISem inducen la formación de cuerpos apoptóticos en las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774, por lo tanto las células tratadas con extractos sufrirán degradación del ADN.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Detectar la fragmentación del ADN, como indicador de apoptosis, en las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774 y células mononucleadas normal de ratón inducida por los extractos crudos de genotipos de *Sechium* spp.

5.2. Objetivos particulares

- Detectar la inducción de la fragmentación del ADN en las líneas celulares leucémicas mieloides P388 y J774 mediado por el extracto crudo de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Jacq.) Sw.
- Detectar la inducción de la fragmentación del ADN en las líneas celulares leucémicas mieloides P388 y J774 mediado por el extracto crudo de *S. chinantlense*.
- Detectar la inducción de la fragmentación del ADN en las líneas celulares leucémicas mieloides P388 y J774 mediado por el extracto crudo de *S. compositum*.
- Detectar la inducción de la fragmentación del ADN en las líneas celulares leucémicas mieloides P388 y J774 mediado por el extracto crudo de, híbrido H-387-07-GISem.
- Evaluar el efecto de los extractos de *Sechium* spp., en la apoptosis temprana por medio de la traslocación de fosfatidilserina.
- Detectar la inducción de la fragmentación del ADN utilizando las dosis medias inhibitorias más altas (IC₅₀) de los extractos crudos de las especies silvestres de *Sechium* spp., en células mononucleadas de medula ósea de ratones CD-1.

6. Metodología

La investigación se realizó a través de 9 ensayos biológicos, cada uno con tres repeticiones utilizando dos líneas celulares mieloides leucémicas y células de médula ósea de ratón CD-1, sometidas a tratamientos con un antineoplásico comercial y cuatro extractos vegetales obtenidos de tres genotipos silvestres del género *Sechium* spp., y un híbrido de éstas, para obtener ADN genómico de cada una de las líneas celulares e identificar un patrón de daño (“escalera de la muerte”) a través de electroforesis y evidenciar la muerte por apoptosis como resultado de los tratamientos aplicados, así como, la posible selectividad celular de los extractos. También se realizó la detección de apoptosis temprana por medio Anexina V, a través de citometría de flujo en un citómetro (BD Facsaria II).

6.1. Material biológico

6.1.1. Líneas celulares

La línea celular macrofágica P388 es ampliamente usada para la evaluación en el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Es proveniente de ratón DBA/2, presenta características típicas de macrófagos, como vesículas lisosomales, capacidad de adhesión, fagocitosis y formación de rosetas, vía la expresión de receptores, y adicionalmente tienen la capacidad de formar tumores malignos y secretar IL-1 al medio (Hirose *et al.*, 1985).

La línea celular macrofágica J774 también se utiliza en la evaluación del desarrollo de fármacos anticancerígenos. Proviene de un reticulosarcoma generado en una hembra de ratón BALB/c en 1968. Tiene capacidad de formar tumores metastásicos en ratones, presenta receptores Fc, libera al medio IL-1 y lisozima, además se activan con anticuerpos dependientes de fagocitosis y su crecimiento es inhibido en presencia de LPS y sulfato de dextrán (Ralph *et al.*, 1977).

6.1.2. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares se obtuvieron a través de la American Type Culture Collection (ATCC) las cuales se cultivaron con el medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL NY, USA), y posteriormente se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ y humedad saturante, manteniendo una densidad celular para P388 $1 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, J774 $5 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, con resiembra cada 48 horas, momento donde alcanzó un promedio del 70% de saturación y fueron resembradas (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan *et al.*, 1993).

Posteriormente cada línea celular fue estimulada con la IC₅₀ de los extractos de *Sechium* spp., utilizando como primer condición a células control (sin estímulo, y sin PBS), y PBS como vehículo general. Las concentraciones de extracto para J774 fueron: H-387-07-GISem $0.61 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; *S. compositum* $1.96 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; *S. chinantlense* $0.26 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; *S. edule* var. *nigrum spinosum* $0.93 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. De igual forma, para la línea celular P388 se usaron: $1.38 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de H-387-07-GISem; $0.98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de *S. compositum*; $0.98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de *S. chinantlense*, y $1.18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de *S. edule* var. *nigrum spinosum*; en todos los casos el control positivo fue Ara-C (5 μM). Para la variable Anexina V, las líneas celulares estuvieron bajo el estímulo de la IC₅₀ de los extractos 68 y 62 horas para J774 y P388 antes de su evaluación, de igual manera para fragmentación internucleosomal del ADN, la permanencia ante el estímulo fue de 68 y 62 horas para J774 y P388 respectivamente.

6.1.3. Cultivo de células mononucleadas de médula ósea (cmn)

Se usaron ratones clínicamente sanos de la cepa CD1, que fueron sacrificados por dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco BRL, USA). Posteriormente se separaron las CMN mediante un gradiente de densidad (ficol densidad= $1.077 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Sigma, St Louis, USA). Por último se cultivaron las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e Interleucina 3 recombinante de ratón, a una densidad de $100,000 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ en placas de 5ml (Corning NY, USA). Después de cuatro días de cultivo, las células fueron estimuladas con la IC₅₀ más alta de cada uno de los extractos de *Sechium* spp., al tiempo más alto de

estímulo utilizado en las líneas celulares leucémicas (68 horas para 774); para ello se utilizó como primer condición, a células control (sin estímulo, y sin PBS) y PBS como vehículo. Las concentraciones de extracto para el cultivo de CMN fueron: H-387-07-GISeM ($1.38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); *S. edule var. nigrum spinosum* ($1.18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); *S. compositum* ($1.96 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); *S. chinantlense* ($0.98 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); tomando como control positivo Ara-C ($5 \mu\text{M}$).

6.2. Variables

Las variables evaluadas fueron Anexina V, y fragmentación internucleosomal del ADN (“escalera de la muerte”) a través de electroforesis en gel de agarosa.

6.2.1. Anexina V

Las células leucémicas de ratón se cultivaron y trataron bajo las condiciones antes descritas. Después de los respectivos tiempos de cultivo bajo el estímulo de los extractos de *Sechium* spp., se analizaron mediante el Kit de Anexina V (BD pharmagen™ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit). Brevemente, las células fueron lavadas con solución buffer de fosfatos y se realizó un conteo celular, posteriormente se agregó buffer de Anexina V; se tomaron estas células y se colocaron en un tubo falcon de 5 ml, subsecuentemente se agregó isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual es positivo para células que se encuentren en apoptosis temprana, y células que están en apoptosis tardía, o muertas, ya sea por apoptosis o necrosis. Hecho lo anterior se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en obscuridad; posteriormente se agregó buffer de Anexina V y se colocaron en obscuridad y hielo. Finalmente se analizaron por citometría de flujo en un citómetro (BD Facsaria II) antes de una hora.

6.2.2. Fragmentación internucleosomal del ADN

Una vez que las células fueron estimuladas con la IC50 de los tratamientos (extractos vegetales) para cada línea celular a sus respectivos tiempos (48, 60, 68 horas), se colectaron por centrifugación convencional en una centrifuga (HERMLE Z300K) a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante ocho minutos a 17 °C con lo cual se obtuvo el botón celular, posteriormente se realizó un lavado con PBS (1ml) y se resuspendió hasta que el botón se encontrará totalmente disuelto, y de nueva cuenta se centrifugó a las condiciones antes mencionadas.

- a. Se decantó casi todo el sobrenadante (PBS) dejando aproximadamente 40 µL con lo cual se resuspendió el botón celular; enseguida se agregaron 600 µL de buffer de lisis y se suspendió suavemente hasta que el botón celular desapareciera; posteriormente se agregaron 20 µL de la solución stock ($4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de proteinasa K (Promega Madison, WI, USA) y se mezcló por inversión (hasta 60 veces). Hecho lo anterior se incubó en el shaker (Orbital Incubation Shaker GyromaxTM 703) con agitación a 37 °C por 24 horas.

Nota: Si el experimento requiere de un tratamiento mucho más rápido, el paso anterior se puede modificar cambiando el tiempo de incubación de proteinasa K, de 24 a 4 horas, siguiendo las indicaciones subsiguientes.

- b. Transcurridas las 24 horas se adicionaron 7.5 µL de RNAsa (Sigma-Aldrich, USA) a cada tubo eppendorf, y se incubaron durante una hora a 37 °C. Al cabo de este tiempo, se sacaron las muestras de la incubadora y se adicionaron 0.9 ml de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se mezcló 50 veces por inversión.
- c. Hecho el paso anterior se agregaron 0.3 ml de cloroformo-fenol-alcohol isoamílico y mezcló vigorosamente por inversión 60 veces (no se recomienda usar en este paso el vortex (Vortex-Genie 2), debido a que los fragmentos de ADN se pierden y no se obtiene lecturas posteriores) y se centrifugó a 18000 rpm durante 32 minutos a 4 °C en una centrifuga (HERMLE Z300K).

- d. Realizada la centrifugación, se transfirió la fase superior (acuosa) a un tubo eppendorf nuevo (“new fresh”); (esto se realizó con una pipeta de 200 µl, con cuidado de no desprender el botón de proteínas que se encuentra al fondo de la fase acuosa)

Nota: Antes de colocar toda la fase acuosa de cada una de las muestras en el tubo eppendorf nuevo, este ya contenía 600 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) al 100% el cual debe proceder de condiciones de almacenamiento a 4 °C (a temperatura ambiente, no funciona), y se mezcla por inversión 50 veces.

- e. Realizado el paso anterior, las muestras se centrifugaron de nueva cuenta, a las condiciones antes mencionadas. Posteriormente se decantó el sobrenadante dejando que el botón de ADN se seque a temperatura ambiente (22 °C) por no más de cinco minutos; pasado este tiempo el pellet de ADN se resuspendió en 30 µl de buffer TE.

Nota: Cuando la muestra presente un aspecto viscoso, se agregaron secuencias de 30 µl de buffer TE hasta alcanzar un estado de dilución que generalmente se puede alcanzar con 100 µl de buffer TE como máximo, y se posteriormente se dejaron hidratar por 12 horas a temperatura ambiente; hecho lo anterior las muestras están listas para su corrimiento en un gel de electroforesis.

- f. El corrimiento de las muestras se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.5 %. El proceso de preparación del gel fue siguiente: Se pesaron 0.75 gramos de agarosa UltraPure™ Agarose (Invitrogen), en una balanza analítica (Sartorius CP64), posteriormente la agarosa se vertió en un matraz Erlenmeyer (previamente purgado con agua milli-Q, Hidróxido de sodio y luz UV por 25 minutos) y se agregaron 50 ml de buffer triácido bórico EDTA 1X (TBE), se agitó lentamente con movimientos circulares evitando la formación de grumos, y se introdujo al microondas por periodos de 30 segundos hasta que la agarosa inicia su ebullición (aproximadamente a los 60 °C), y se mezcló nuevamente agitándola con movimientos circulares hasta que no se observaron grumos y se tornó transparente.

- g. Una vez lista la agarosa se dejó enfriar por 15 minutos a 22 °C y se adicionaron 40 µL del stock (0.5 µg·ml⁻¹) de bromuro de etidio (agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos) (Sigma-Aldrich), y se agitó nuevamente para que éste se incorpore adecuadamente a la agarosa.
- h. Hecho lo anterior se esperó a que la agarosa se enfriara. Posteriormente se agregó la agarosa a la cámara de electroforesis (Gibco BRL, Horizon® 58) (previamente preparada: nivelada, con peines y barreras) y en un solo movimiento se llenó, evitando la formación de burbujas, y se dejó reposar por 25 minutos hasta que el gel solidificó, lo cual se identificó por una apariencia ligeramente turbia.
- i. Una vez solidificado el gel, se adicionó a la cámara buffer TBE 1X hasta cubrir el gel (aproximadamente 2 cm por arriba). Posteriormente se colocaron en los pozos del gel, 4 µL de marcador de pesos moleculares (Fermentas O' GeneRuler™), 2 µL de buffer de carga (Loading Buffer al 1 %) y 8 µL de muestra de ADN (cada una mezclada previamente con el buffer de carga).
- j. El corrimiento se llevó a cabo en una cámara de electroforesis (Gibco BRL, Horizon® 58) a 100 voltios por 90 minutos. Hecho esto, los geles se revelaron en un transiluminador (Foto/Eclipse™, FotoDyne), y se tomó la fotografía con el programa Collage™ Image Information Extraction & Reduction versión 3.0, las imágenes obtenidas se imprimieron en una impresora (MITSUBISHI Video copy Processor P67U).
- k. La lectura del gel se llevó a cabo por medio de la fotografía, identificando las diferencias entre ADN íntegro y el fragmentado (apoptosis), donde el primero muestra un tamaño superior al fragmentado y se observa que se ubica en la parte superior, cercano a los 1000 kb. El ADN fragmentado se identifica por un patrón denominado “laddering” (peldaños o escalera en español) con un tamaño aproximado de 180 a 200 kb, lo cual es evidencia (hallmark por su nombre en inglés) de la fragmentación del ADN.

6.2.3. Manejo general para el cultivo celular

El manejo general de las células antes de la extracción para ambas técnicas, fue el siguiente:

Las líneas celulares leucémicas (J774 y P388) y normales de ratón CD-1 fueron estimuladas con la IC_{50} de los extractos de *Sechium* spp., a los tiempos establecidos, se colectaron por centrifugación convencional en una centrifuga (HERMLE Z300K) a 1500 revoluciones por minuto (RPM) durante ocho minutos a 17 °C, con lo cual se obtuvo el botón celular, posteriormente se realizó un lavado con PBS (1ml) para eliminar impurezas y se resuspendió hasta que el botón se encontrará totalmente disuelto; de nueva cuenta se centrifugó a las condiciones antes mencionadas, y se obtuvo el botón celular con el cual se iniciara el proceso de extracción de material genético.

7. Resultados y Discusión

7.1. Efecto de los extractos crudos sobre la proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón J774 y P388.

Los resultados obtenidos respecto de la aplicación de los extractos crudos mostraron que existe reducción de la densidad celular de las líneas leucémicas mieloides de ratón (observadas bajo el microscopio de luz a 10X) P388 y J774, después 68 y 60 horas respectivamente, comparado a lo observado en el control y vehículo en presencia de la IC₅₀ de los extractos de híbrido H-387-07-GISem, *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Sehium compositum* y *Sechium chinantlense*; alcanzando una reducción de la densidad celular cercana al inducido por el antineoplásico comercial Ara-C (Citarabina®) (Figura 10, 11).

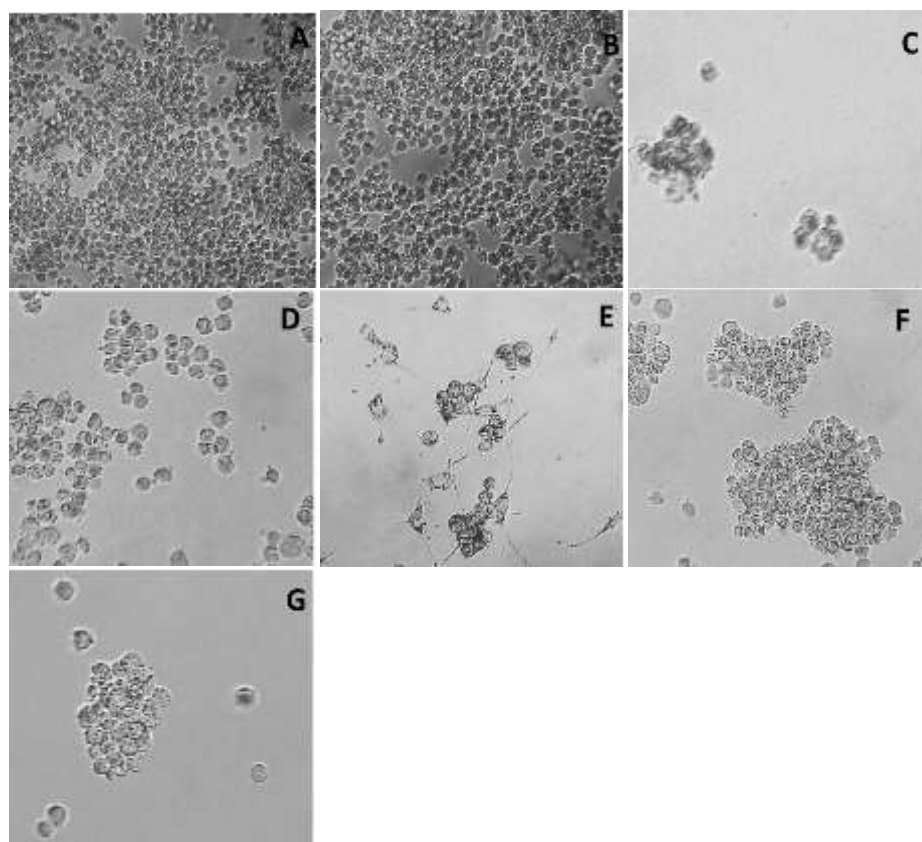


Figura 10. Reducción de la densidad celular en J774 observada bajo el microscopio (10X) después de 68 horas de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sehium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

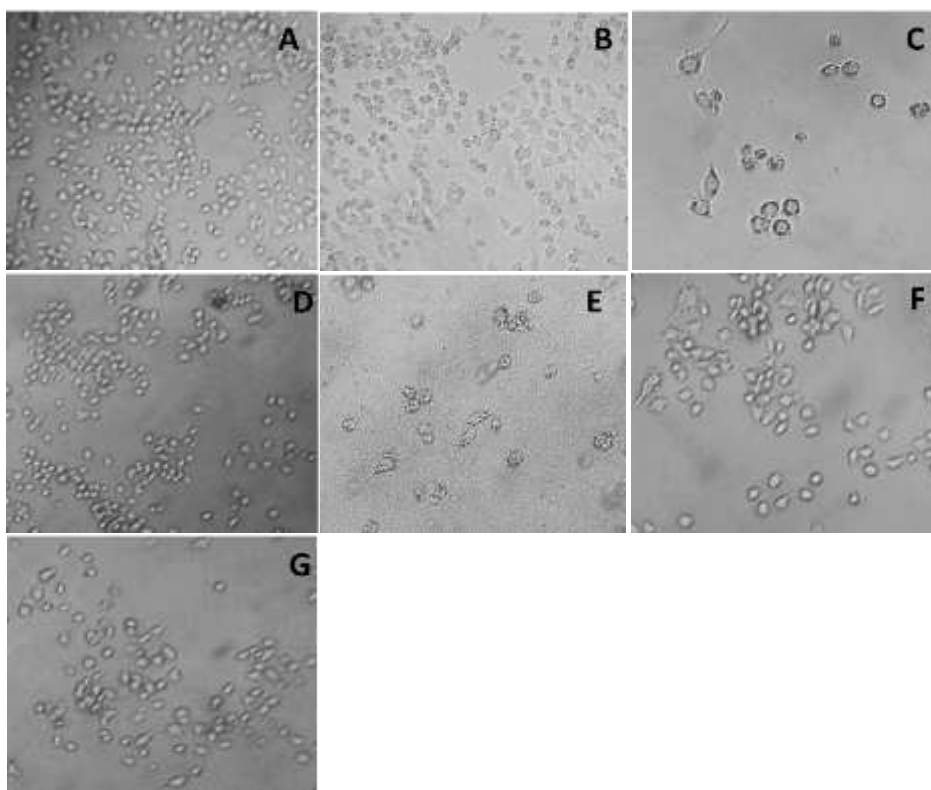


Figura 11. Reducción de la densidad celular en P388 observada bajo el microscopio (10X) después de 60 horas de estímulo con la IC50 de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

7.2. Efecto de los extractos vegetales crudos sobre la translocación de fosfatidilserina en líneas leucémicas mieloides de ratón J774 Y P388.

Al evaluar por citometría de flujo, la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS), se observa que las células del control y vehículo, se agruparon en el cuadrante Q3 que indica ausencia de translocación, lo cual se interpreta como células viables (sin tratamiento), mientras que con la adición de la IC₅₀ experimental de cada extracto vegetal, la población pasó al cuadrante Q4 y Q2 que muestran translocación de PS lo cual es indicativo de apoptosis temprana o tardía respectivamente (Figuras 12 y 13, D, E, F, G).

Respecto a la línea celular J774 y P388 en la condición de *Sechium edule var. nigrum spinosum*, se observó que la población de células positivas para PS migró a la región Q2 que indica apoptosis tardía. Una posible explicación a ello, es que podría deberse a la reducida densidad celular, ya que el extracto de este genotipo, tenía la concentración más alta y por lo tanto el daño causado a células fue mucho más grave. Otro punto a destacar es que los datos obtenidos por el citómetro de flujo indicaron que del porcentaje total de la población en ambas líneas celulares tratadas con extracto, al menos el 50 % se encontró en un proceso de apoptosis ya sea temprana (Q4) o tardía (Q2) (Tabla 3 y 4).

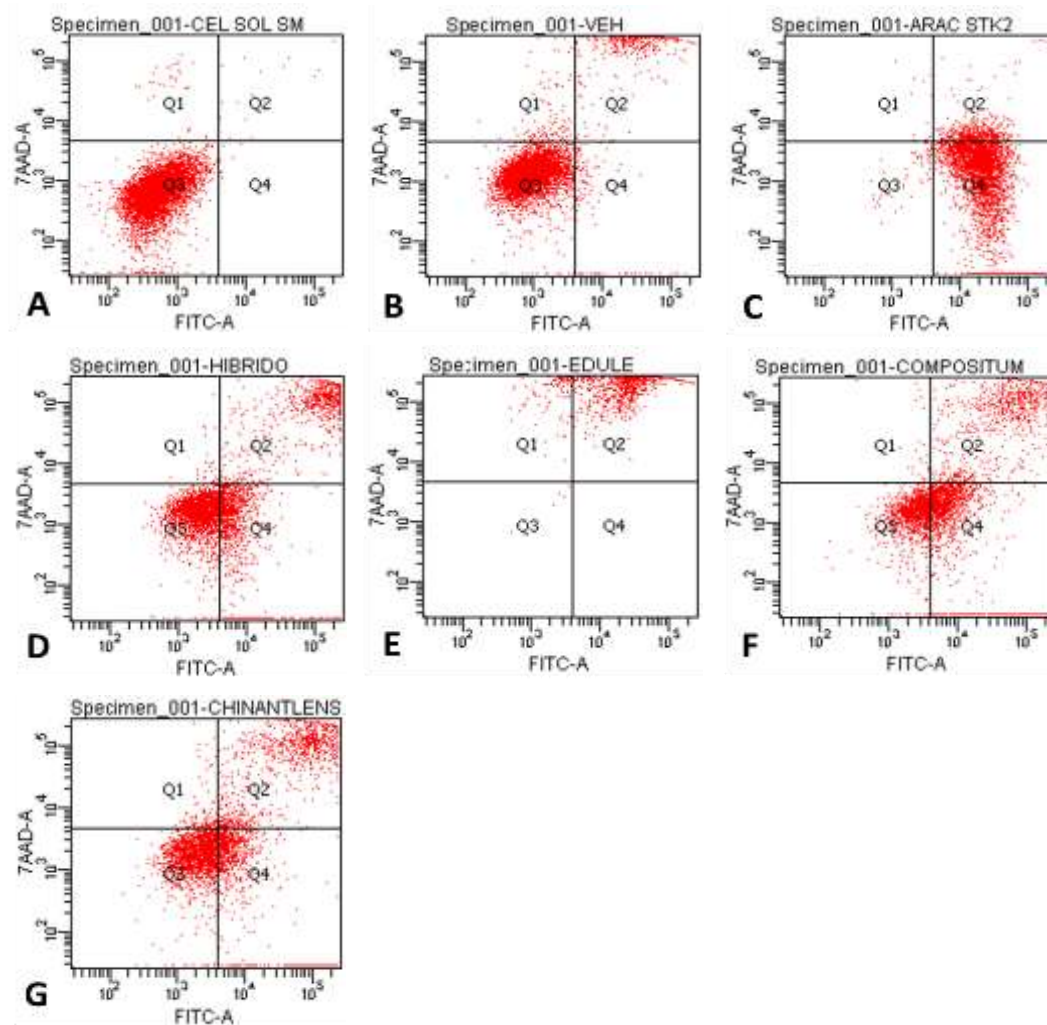


Figura 12. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células J774 a las 68 horas de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

Tabla 3. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células J774 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.

Tratamientos	Células por cuadrante (%)			
	Q1	Q2	Q3	Q4
Control	0.5	0.2	99.2	0.1
Vehículo	1.7	9.9	86.1	2.3
Ara-c [®]	0.1	6.5	0.8	92.6
Hibrido 387-07-GISeM	0.6	17.5	53.2	28.7
<i>Sechium edule</i>	4.4	95.5	0.1	0.0
<i>Sechium compositum</i>	0.6	21.0	33.2	45.1
<i>Sechium chinantlense</i>	2.1	23.9	48.9	25.0

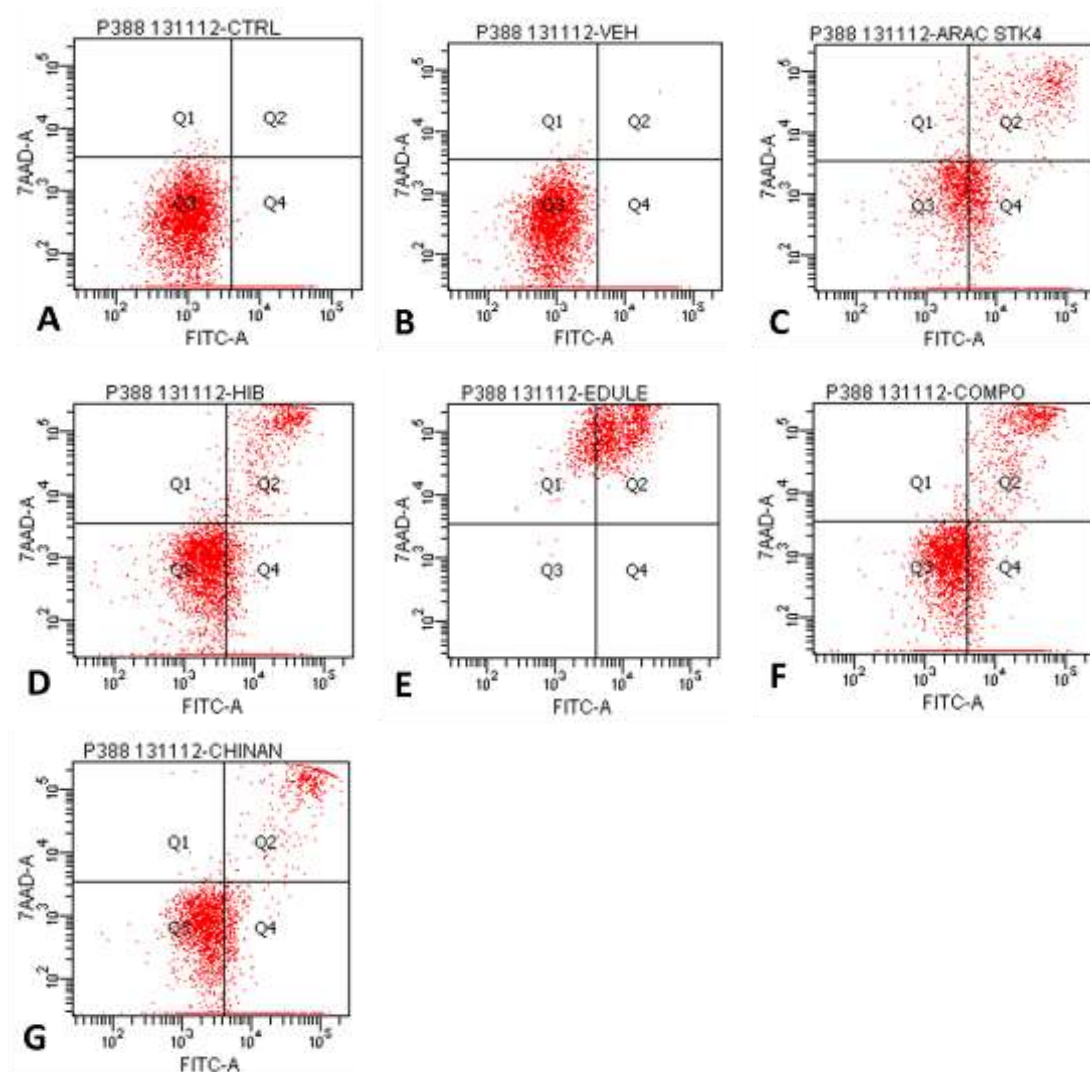


Figura 13. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células P388 a las 60 horas de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sehium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

Tabla 4. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células P388 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.

Tratamientos	Células por cuadrante (%)			
	Q1	Q2	Q3	Q4
Control	0.1	0.0	82.0	17.9
Vehículo	0.1	0.1	84.1	15.7
Ara-c [®]	10.0	18.2	34.1	37.7
Híbrido 387-07-GISeM	0.8	12.8	63.3	23.0
<i>Sechium edule</i>	17.1	82.8	0.1	0.0
<i>Sechium compositum</i>	0.7	16.2	50.6	32.6
<i>Sechium chinantlense</i>	0.2	9.0	51.6	39.3

Estudios realizados con anterioridad, aplicando extractos crudos obtenidos de frutos de ocho variedades de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., mostraron un efecto de inhibición de la proliferación de las líneas cancerígenas de ratón P388 (Cadena *et al.*, 2005). Monroy *et al.* (2008) evaluó el extracto de *S. edule* var. *nigrum spinosum* sobre las líneas tumorales HeLa y L929 y registró efecto antiproliferativo sobresaliente en forma dosis dependiente. De igual forma, Tiburcio (2011) y Rivera (2011), demostraron un efecto similar sobre la proliferación de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774, L929 y HeLa respectivamente, al aplicar extractos crudos de frutos de *S. chinantlense*, *S. compositum* e híbrido H-387-07-GISeM, y en todos los casos también se observó inducción a la formación de cuerpos apoptóticos. Por ello, comprobar la inducción de la muerte celular por apoptosis es relevante, si se considera que éste es un proceso fisiológico natural programado por el organismo para su beneficio, y a este respecto, se ha sugerido por diversos autores que puede existir una muerte por apoptosis “temprana” (Van Engeland *et al.*, 1998; Kagan *et al.*, 2000; Matin *et al.*, 1995; Colin-Valenzuela *et al.*, 2010; Schlegel *et al.*, 2010; Chaurio *et al.*, 2009) a través de la detección del fosfolípido fosfatidilserina (PS), ya que la apoptosis es un proceso de muerte celular en el que la integridad de la membrana

se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente. Cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis uno de los eventos tempranos de este tipo de muerte celular, es la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular (Alfaro *et al.*, 2000; Colin *et al.*, 2010; Schlegel *et al.*, 2010; Chaurio *et al.*, 2009) ; este fenómeno conocido como exteriorización de la fosfatidilserina, ha sido identificado como una de las características prominentes y tempranas de la muerte celular programada o apoptosis (Martin *et al.*, 1995; Bacsó *et al.*, 2000), ya que al exponerse la PS en la cara externa de la membrana plasmática provoca un cambio de superficie que es común en la mayoría de las células apoptóticas.

Lo anteriormente citado, tiene varias consecuencias biológicas potenciales, una de las cuales es el reconocimiento y eliminación de la célula apoptótica por los fagocitos, siempre y cuando las células se encuentren disgregadas en pequeños pedazos rodeados por una membrana, los cuales en ocasiones llevan partes de orgánulos dentro y que comúnmente son llamados cuerpos apoptóticos (Van engeland *et al.*, 1998; Kagan *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1995; Colin-Valenzuela *et al.*, 2010; Schlegel *et al.*, 2010; Chaurio *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el presente estudio, pueden tomarse como evidencia de que los extractos vegetales evaluados, pueden activar la ruta de muerte por apoptosis, ya que este fosfolípido se expresa únicamente en este tipo de muerte celular y es uno de los marcadores principales (Taylor *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009).

7.3. Detección de la fragmentación internucleosomal del ADN en líneas celulares leucémicas mieloides de ratón J774 Y P388.

La fragmentación del ADN es considerada como la técnica por excelencia para la detección de apoptosis (Taylor *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2012), dado que el proceso apoptótico tiene la capacidad de ser reversible, siempre y cuando no llegue al punto donde el ADN es fragmentado, el cual es un punto de no retorno para la célula, y por tanto evidencia definitiva de muerte por apoptosis (Tang *et al.*, 2009; Bacsó *et al.*, 2000). La aplicación de los extractos vegetales a las células J774 y P388, indujeron fragmentación de ADN, debido a que se expresó un patrón en “escalera” (Wyllie, 1980), e indica que bajo las condiciones del presente estudio, los extractos llevan a las células a un punto de daño irreversible (Figura 14 y 15); y por consecuencia a un proceso de apoptosis completo. El patrón en “escalera” fue formado por fragmentos oligonucleosomales de múltiplos entre 180 a 200 pares de bases (pb), lo cual es un prominente marcador bioquímico de células apoptóticas (Wyllie, 1980) (Figura 14 y 15).

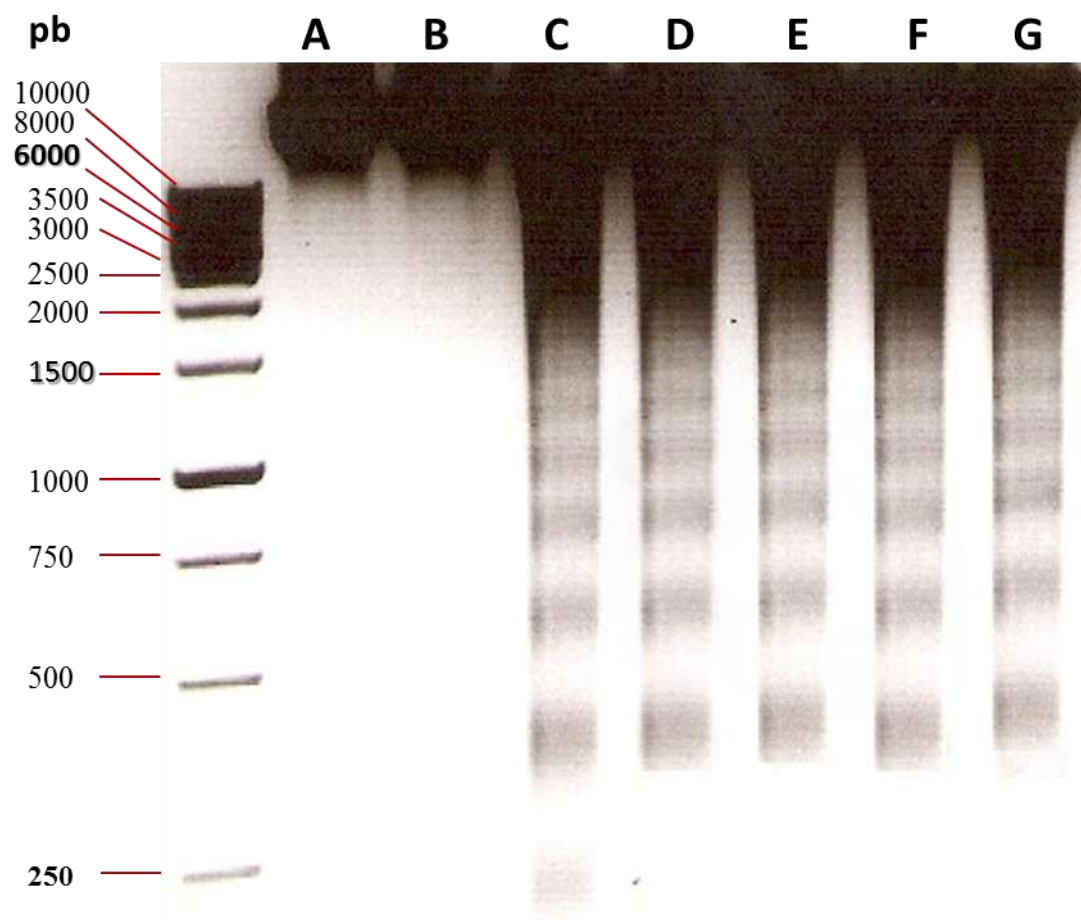


Figura 14. Fragmentación internucleosomal del ADN de células J774 a las 68 horas de estímulo con la IC_{50} de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

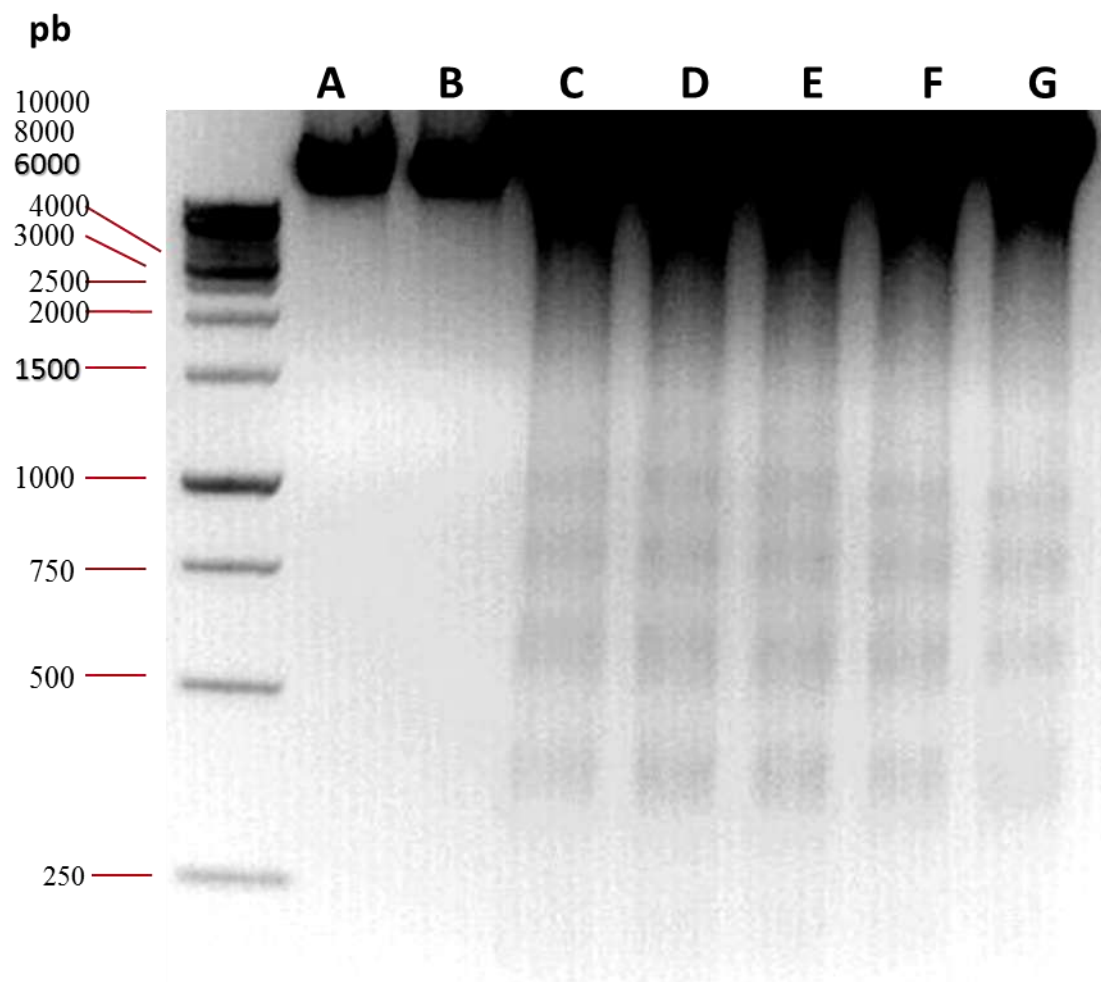


Figura 15. Fragmentación internucleosomal del ADN de células P388 a las 60 horas de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*) F: *Sehium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

Debido a que la fragmentación del ADN es el resultado de la degradación de la cromatina, mediado por endonucleasas, se opone ciertamente a cualquier posibilidad futura de división celular, pero su propósito real es hacer que la cromatina sea más manejable para su posterior eliminación por las células fagocíticas, y así evitar una reacción inflamatoria que compromete la salud (Rojas *et al.*, 2009), pues una falla en la degradación del ADN de las células apoptóticas resulta en la activación del sistema inmune innato (Rojas *et al.*, 2009; Kohki *et al.*, 2003).

7.4. Efecto de las IC50 más altas de los extractos de *sechium* spp., sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1.

Una de las preocupaciones de los oncólogos es inducir un daño máximo a las células neoplásicas considerando el menor daño a las células normales (Faujan *et al.*, 2010). Por lo anterior fue importante analizar el efecto de los extractos sobre células normales de médula ósea.

Los resultados obtenidos posterior al uso de las concentraciones más elevadas de los extractos vegetales, reveló que la proliferación de las células mononucleadas de médula ósea normal de ratón se reduce notablemente solo en Ara-c[®] y *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Figura 16 A, B).

En los casos particulares del Híbrido H-387-07-GISem, *Sehium Compositum* y *Sechium chinantlense* (Figura 16 D, F, G) se observa que la densidad celular es muy parecida a la de los controles (Figura 16 A, B), lo cual podría ser indicativo de que dichos extractos no afectan en gran medida la proliferación de células normales. Respecto a *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Figura 16 E), aun cuando se observa que reduce la densidad celular en células normales, no alcanza los niveles de reducción observadas en las líneas leucémicas observadas en las Figuras 10 E, 11 E.

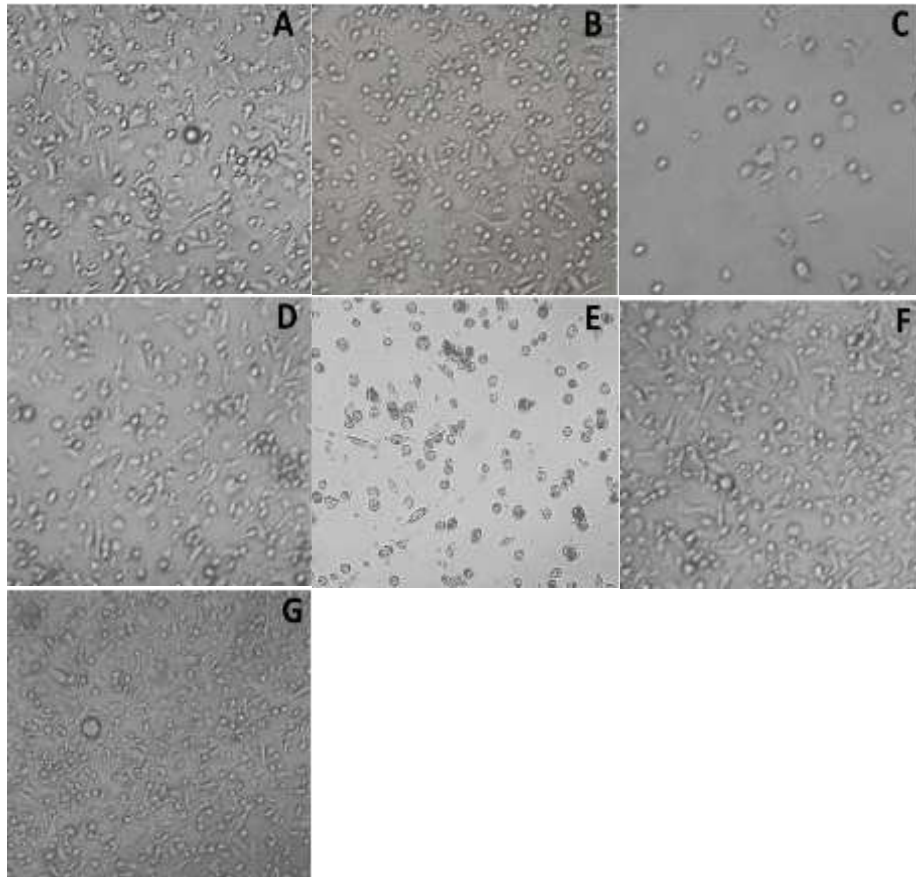


Figura 16. Densidad celular observada de células mononucleadas de medula ósea normal de ratón CD-1 bajo el microscopio (10X) después de 68 horas de estímulo con las IC_{50} más altas de cada uno de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

7.5. Efecto de la IC₅₀ más alta de los extractos vegetales sobre la translocación de fosfatidilserina en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1

En cuanto a la translocación de PS, el análisis de citometría de flujo, mostró que en todas las condiciones los extractos vegetales dan lugar al inicio de la apoptosis, puesto que en todas las condiciones evaluadas se registró un porcentaje de células positivas para Anexina V en los cuadrantes Q4 y Q2 (apoptosis temprana y tardía respectivamente) (Figura 17 A, B, C, D, E, F, G) y (Tabla 6).

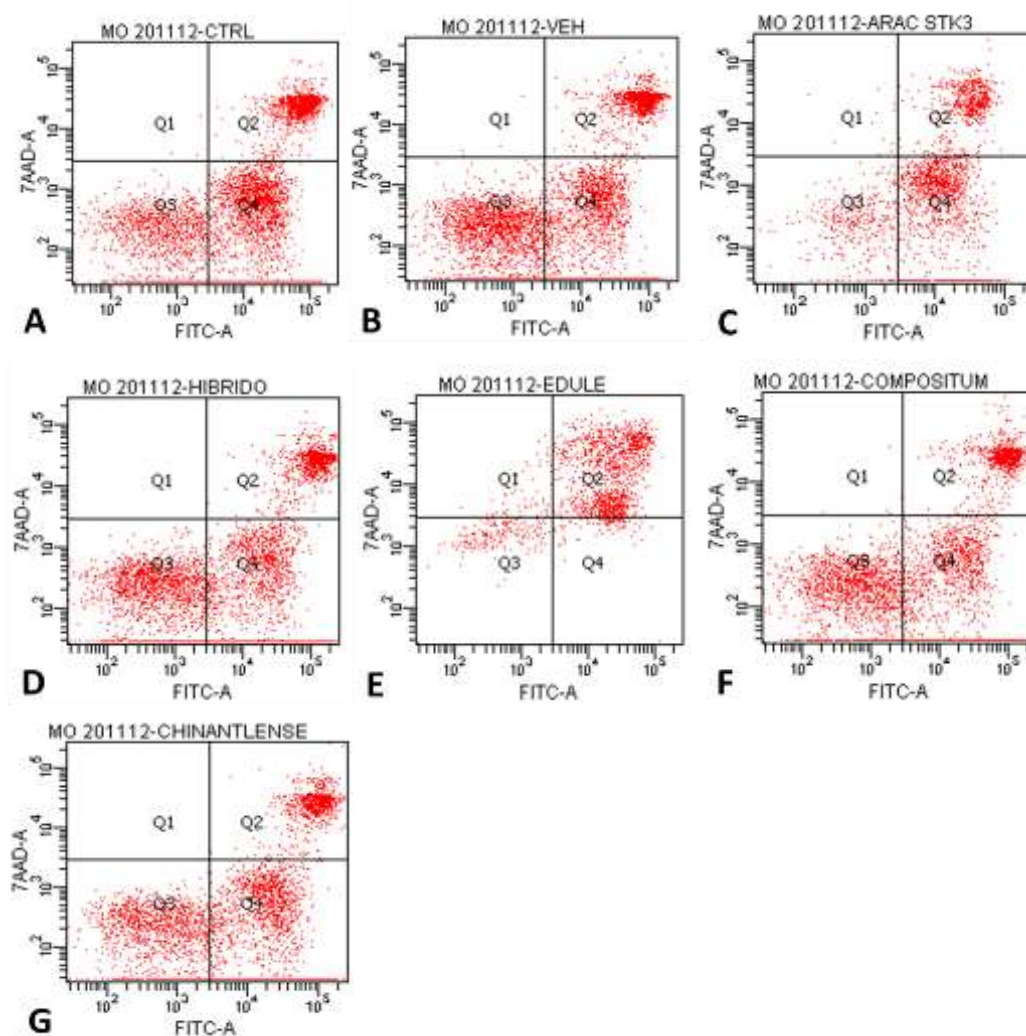


Figura 17. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 después de 68 horas de estímulo con las IC₅₀ más altas de cada uno de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISem, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

Tabla 5. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.

Tratamientos	Porcentaje de células presentes por cuadrante			
	Q1	Q2	Q3	Q4
Control	0.1	25.1	24.2	50.7
Vehículo	0.1	21.9	37.0	41.1
Ara-c®	0.4	24.7	15.1	59.8
Hibrido 387-07-GISeM	0.0	20.8	35.2	43.9
<i>Sechium edule</i>	3.2	77.7	11.4	8.3
<i>Sechium compositum</i>	0.1	19.2	35.7	45.0
<i>Sechium chinantlense</i>	0.0	17.6	30.2	52.2

7.6. Detección de la fragmentación internucleosomal del ADN en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1.

Después de observar que los extractos indujeron la translocación de PS en células normales, fue imprescindible evaluar si los extractos llevan a las células de médula ósea a una degradación del ADN. A este respecto, los geles revelaron que los extractos vegetales no tienen efecto alguno sobre el material genético de las células normales de médula ósea normal de ratón, pues se observa que en ninguna de las concentraciones de dichos extractos vegetales empleados para esta investigación, indujo la fragmentación del ADN a excepción del antineoplásico comercial Ara-c® (Figura 18).

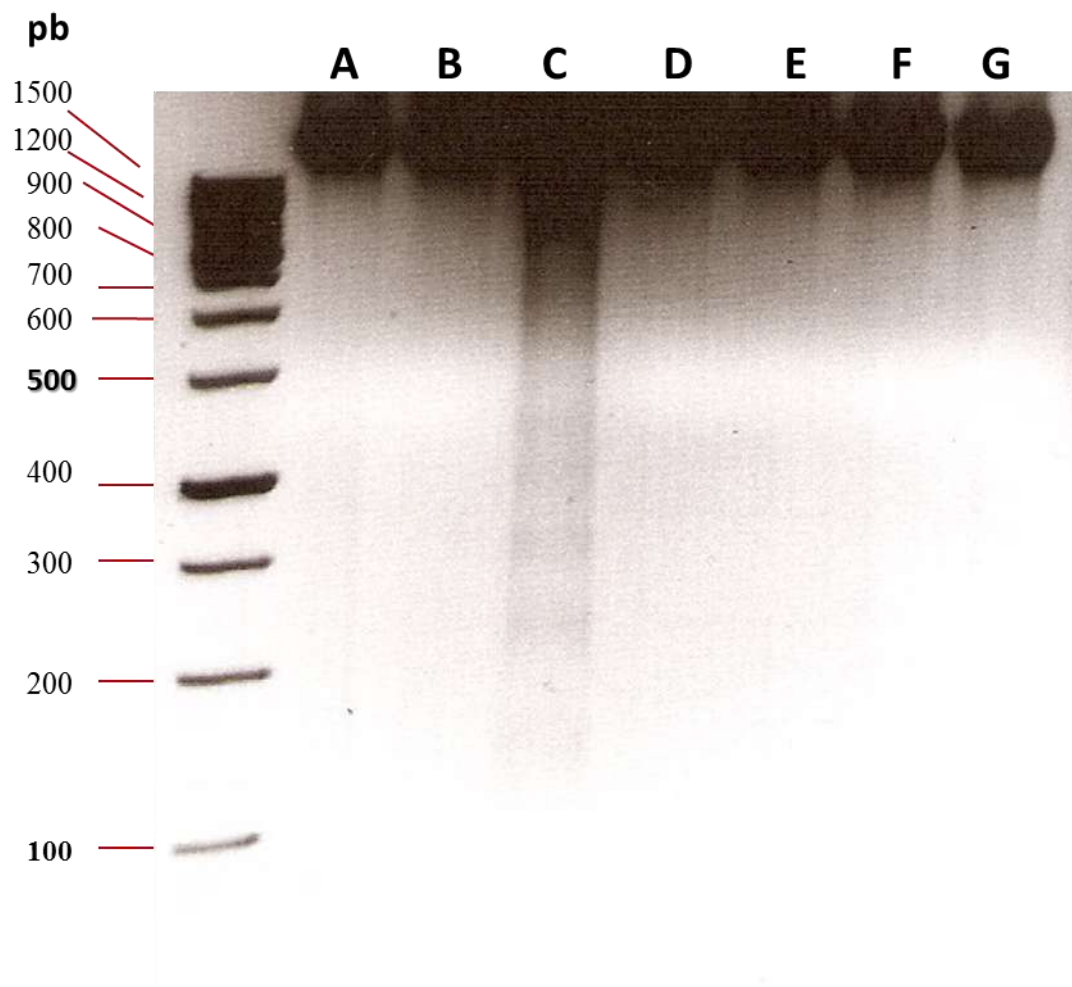


Figura 18. Fragmentación internucleosomal del ADN después de 68 horas de estímulo con las IC_{50} más altas de cada uno de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 μ M) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07-GISeM, E: *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* F: *Sechium compositum*, G: *Sechium chinantlense*.

El dato anterior es relevante, ya que, considerando que todos los extractos indujeron la translocación de PS en todas las condiciones en células normales (Figura 17), se esperaría que al extraer el ADN, este estuviera fragmentado, pues las poblaciones celulares se encontraron agrupadas en los cuadrantes positivos para muerte celular por apoptosis (Q4 y Q2) al igual que en las líneas celulares leucémicas, pero los resultados indicaron lo contrario, pues el material genético de las células normales se observó plenamente íntegro, lo que indica que estas células no sufrieron muerte celular por apoptosis. También cabe resaltar que al observar los dot blot del análisis de citometría de flujo, las poblaciones

celulares registraron el mismo patrón de “migración” que los controles, por lo cual los resultados fueron similares en la fase de extracción de ADN de las células normales, tratadas con los diferentes extractos de *Sechium* spp.

La gran cantidad de células positivas para PS, detectada en el análisis de citometría de flujo, se puede explicar, ya que una célula que tiene comprometida su viabilidad trasloca PS, pero esto no indica que las células mueran inmediatamente por apoptosis ya que los mecanismos de reparación celular pueden revertir el daño y evitar la fragmentación de DNA (Bacsó *et al.*, 2000; Colin-Valenzuela *et al.*, 2010); además se sabe que PS puede estar también presente de manera basal, en la superficie de los exosomas derivados de plaquetas, células dendríticas, monocitos viables, en la superficie de los macrófagos maduros y en las células B activadas; también es conocido que células normales como los macrófagos expresan PS, incluso más que las propias J774 (Chaurio *et al.*, 2009; Callahan *et al.*, 2000), razón por la cual no se detecta PS basal en J774 pero si en células normales (Figuras 12, 13, 17).

El hecho de que diferentes extractos de *sechium* spp., induzcan la translocación de la PS y a la fragmentación del ADN, sugiere que la caspasa-3 o -7 estuvieron presentes en su forma activa, ya que ambos marcadores bioquímicos necesitan forzosamente de la activación y ejecución de estas caspasas para expresarse en las células apoptóticas; principalmente la caspasa-3, la cual es la principal responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos, aunque DFF45 (inhibidor de DFF40) no sólo puede ser cortada por la caspasa-3, si no que también puede ser cortada por la caspasa-7 aunque con menor eficacia que la caspasa-3 (Lin *et al.*, 2009; Widlak, 2000; Chaurio *et al.*, 2009; Callahan *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 1998; Cory, 2002)

Cabe resaltar que el potencial antiproliferativo de los extractos del Híbrido H-387-07-GISem, *Sehium compositum* y *Sechium chinantlense*, aun usando concentraciones experimentales (IC_{50}) como las utilizadas en la presente investigación, se ubican en niveles inferiores a $20 \mu g \cdot ml^{-1}$, lo cual de acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Boik, 2001), los podría clasificar como agentes con potencial anticancerígeno de

interés oncológico equivalente a moléculas puras cuyo nivel de IC_{50} es menor a $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, incluso muy superior a la actividad de extractos de al menos 76 plantas, incluyendo a *Momordica balsamina* que es una cucurbitácea, con una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sobre la línea celular de cáncer de pecho MCF7, de los cuales sólo tres especies mostraron un efecto citotóxico con IC_{50} menor a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Abu-Dahab *et al.*, 2007).

Una rasgo importante más, de los extractos vegetales utilizados, es que son mucho más potentes comparados con otros extractos vegetales, tales como, los obtenidos de *Terminalia catappa* L. que tiene actividad antiproliferativa sobre un carcinoma de pulmón humano (A549) en concentraciones mayores de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se consideró como un potencial antimetastásico (Chu *et al.*, 2007); de igual forma los obtenidos de *Pinus massoi* Lamb., que inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama (MCF-7 y HELF), en un rango de concentraciones de 3.5 a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Limei *et al.*, 2008), o el extracto de hojas de *Polyalthia longifolia* (Sonn) Thw, que mostró potencial anticancerígeno sobre una línea celular de cáncer de colon humano (SW-620) con una IC_{50} de $6.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, y el extracto acuoso de *Unicaria tomentosa* (Will. Ex Roem. & Schult) que exhibió una toxicidad en cultivos tumorales de melanoma SK, tumor de Burkitt 549 y carcinoma de ovario SK-3 con una IC_{50} de $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

También cabe destacar que las concentraciones utilizadas en esta investigación para llevar a cabo la inducción de apoptosis, compiten con moléculas sintéticas como la CASIOPEÍNA III-IA[®] evaluada en líneas tumorales humanas HeLa, MCF7 y SKLU-1 en una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a través de la ruta intrínseca mitocondrial que conlleva a la liberación del citocromo *c* y la caspasa 3 (Barron-sosa *et al.*, 2007), y semisintética como el etopósido que induce la apoptosis en la línea celular leucémica HL-60 con una IC_{50} de $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Kaufmann, 1989).

El hecho de mostrar que los extractos de *Sechium* spp., inducen la fragmentación del ADN en las células leucémicas pero no en las normales indica que los extractos tienen selectividad sobre células tumorales, a diferencia del antineoplásico de uso clínico Ara-C[®]; lo anterior es de vital importancia ya que en la actualidad los medicamentos que se usan

para combatir el cáncer son utilizados específicamente para causar un daño celular, que no es selectivo para las células tumorales, lo cual afecta a todas las células del organismo, resultando en efectos tóxicos adversos para el paciente, estas acciones toxicas pueden ser de tipo: Teratógena, citostática, carcinógena, mutágena, alteración corneal cardiotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica, hemorrágica, vesicante, irritante de piel y mucosas, emetizante y hematológica (Anomino, 2003). De ahí la importancia de tener agentes los cuales induzcan apoptosis, y que para ello requieran de dosis muy pequeñas, además de que sean selectivos para las células cancerígenas, como es el caso de los extractos de *Sechium* spp., utilizados en el presente estudio.

Al igual que los extractos utilizados en el presente estudio, se tienen registro de diferentes moléculas, las cuales muestran ser selectivas tal es el caso del ácido betulínico, el cual es un triterpeno con citotoxicidad selectiva contra el melanoma, y líneas celulares tumorales del cerebro (Zuco *et al.*, 2002), otro caso similar es el de dos agentes combinados como lo son la dihidroartemisinina (un análogo más soluble en agua de la artemisinina) y holotransferrin, los cuales se probaron en células humanas de cáncer de mama *in vitro*, y demostraron que el tratamiento de holotransferrin + dihidroartemisinina es selectivamente tóxico para las células humanas de cáncer de mama, con una toxicidad relativamente baja en las células humanas normales de mama (Singh y Lai, 2001); también se tienen reportes del compuesto galato de epigallocatequina (EGCG), principal ingrediente del te verde, el cual mostró un efecto apoptótico en células transformadas por el virus SV40 WI38 de fibroblastos humanos (WI38VA) comparado con células normales WI38, donde el EGCG mostró inhibir completamente el crecimiento de células WI38VA, pero tenía poco efecto inhibitorio o nulo sobre el crecimiento de las células WI38 (normales) todo evaluado por la técnica TUNEL (Chen *et al.*, 1998).

Aun cuando ya se mencionó, que se conocen algunos compuestos presentes en frutos de *Sechium* spp., es importante caracterizar en mayor medida los fitoquímicos (metabolitos) que se encuentran en los extractos evaluados en la presente investigación. De esta manera se podría determinar si la actividad biológica es exclusiva de un compuesto específico, o

bien, es la suma del conjunto de moléculas con propiedades antineoplásicas y apoptóticas; de igual manera es relevante identificar la ruta (intrínseca “mitocondrial” o extrínseca “ligandos de muerte”) apoptótica que los extractos inducen en las diferentes líneas tumorales, ya que de esta manera, se pueden identificar los factores intracelulares reguladores de la apoptosis, que inducen en mayor medida los extractos vegetales, ya que no todos los tumores alteran la misma ruta de apoptosis como mecanismo de sobrevivencia (Li *et al.*, 2001); pues conociendo los mecanismos de inducción de apoptosis, se puede manipular la inducción de este tipo de muerte con mucha mayor eficacia en cuanto a tiempo y recursos, y mucha mayor contundencia en cuanto a efecto antiapoptótico se refiere.

8. Conclusiones

- Se corrobora que los extractos de Híbrido H-387-07-GISeM, *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Sechium compositum* y *Sechium chinantlense*, disminuyen la densidad de las líneas celulares leucémicas de forma diferencial entre extractos.
- Los extractos crudos del Híbrido H-387-07-GISeM, *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Sechium compositum* y *Sechium chinantlense* inducen la expresión del fosfolípido fosfatidilserina, el cual es un indicador del proceso apoptótico “temprano” en las líneas leucémicas de ratón J774 y P388.
- Los extractos del Híbrido H-387-07-GISeM, *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Sechium compositum* y *Sechium chinantlense* inducen la fragmentación del ADN en líneas celulares leucémicas de ratón, pero no en células hematopoyéticas normales.

9. Perspectivas

- Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere identificar la ruta específica apoptótica que inducen los extractos vegetales de Híbrido H-387-07-GISeM, *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Sechium compositum* y *Sechium chinantlense*.
- Identificar las biomoléculas contenidas en los extractos vegetales, con la finalidad de usarlas como blanco molecular en células tumorales que abrevie e induzca el proceso antiproliferativo de manera apoptótica.
- Identificar los genes que codifican para las biomoléculas en las variantes biológicas de *Sechium* spp., para producir vectores de recombinación y expresión de dichos genes, e inducirlos por medio de choque térmico vía *in vitro* para que eliminen células tumorales con mayor selectividad, eficiencia y reducción de posibles daños secundarios.

10. Referencias bibliográficas

- Abdelnour, A., Ramírez, C., Engelmann, F. 2002. Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía Mesoamericana* 2:147-151.
- Abu-Dahab, R., Afifi, F. 2007. Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*. 75: 121-136.
- Alfaro, M., García, C., Dueñas, G. 2000. Métodos de detección de la apoptosis; aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 46:275-280.
- Al-Jabri, B.M. 2006. Downstream gene expression of wild type p53 tumor suppressor gene versus mutated and null p53. Tesis de Mestría. Tromso, Noruega, Universidad de Tromso. Páginas 1, 3, 8, 13.
- Anonimo.2003. Agentes citostaticos. Protocolos de vigilancia sanitaria especifica. Salud laboral. Instituto Asturiano de Prevención de Riesgos Laborales. Gobierno del Principado de Asturias. Consejería de Justicia, Seguridad Pública y Relaciones Exteriores. Imprime Imprastur Fotomecánica Principado D.L. AS/453/2005. España. 52 p.
- Arango, P.M.C., Llánes, F.L: Díaz, R.T.M. 1997. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Revista Cubana de Oncología*. 13: 126-134.
- Bacsó, Z., Richard, B., Eliason, E., Eliason, J. 2000. The DNA of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. *Cancer Research*. 60:4623-4628.
- Bai, L., Guo, W.Z. 2006. p53: Structure, Function and Therapeutic applications. *Journal of Cancer Molecules* 2: 141-153.
- Barrón-Sosa, L.R., Mora, I.G., Gómez-Ruiz, C., Ruiz-Azuara, L. 2006. Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre CASIOPEINA iii-ia® en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. 2º Congreso Nacional de Química Médica del 2 al 8 de septiembre.

- Bodmer, J.L., Schneider, P., Tschopp, J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochemical Sciences* 27:19-26.
- Boik, J. 2001. *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Oregon Medical Press. USA. Pp 25.
- Brandal, N., Juaristi, J., Aguirre, V., Romero, D.M. 2002. Oncogenes y genes supresores de tumores. Cátedra de Bioquímica. República de Argentina. Universidad Nacional del Noreste. Facultad de Medicina. Páginas 1-12.
- Cadena, I. J. 2001. Colectas de herbario No. 201 a 218 403 a 406 Herbario Hortorio Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Cadena, I. J., Arevalo, G. M. L., Ruiz, P. L. M., Aguirre, M. J. F., Soto, H. M., Luna, C. M., Zavaleta, M. H. A. 2005. Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* (Jacq.) Sw fruit during postharvest. *Postharvest Biology and Technology*, en prensa.
- Cadena-Iñiguez, J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Texcoco, México. Colegio de Postgraduados. Páginas. 56,57,58.
- Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C.H., Soto-Hernández, M., Ruiz-Posadas, L.M., Aguirre-Medina, J.F., Arévalo-Galarza, L. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:835–847.
- Callahan, M.K., Williamson, P., Schlegel, R.A. 2000. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Nature*. 7: 645: 653.
- Cambar, P., Portillo, P., Tabora, E., De Pineda, L., Tovar, O., Casco, J., Alvarado, C., Díaz, G., Casco, B., Cantillo, L. 1980. Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. *Revista Medica de Honduras* 48:97-99.
- Cascales, M.A. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia de Farmacia*. 69: 36-64.
- Chaurio, R.A., Janko, C., Muñoz, L.E., Frey, B., Herrman, M., Gaipl, U.S. 2009. Phospholipids: Key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 14: 4892-4914.

- Chen, Z.P., Schell, J.B., Ho, C.T., Chen, K.Y. 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters*. 129: 173-179.
- Chu, S., Yang, C., Liu, S., Kuo, W., Chang, Y., Hsieh, Y. 2007. *In vitro* and *in vivo* antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 45:1194-201.
- Clavijero, F. J. 1853. *Historia Antigua de México*. Edición facsimilar de la Edición de 1853 por Editorial del valle de México. México pp.13
- Cohen, J. 1993. Apoptosis. *Immunology Today* 14:126 - 138.
- Colin- Valenzuela, A., Gómez López, N., Ávila-Lombardo, R., Barroso-Villa, G. 2010. Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidili serina y oligonucleomas. *Ginecología y Obstetricia de México* 78: 669-676.
- Cook, O. F. 1901. The chayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA. pp. 7-31.
- Cordell, G.A., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M. 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: Colegate, S.M.; Molyneux, R.J. (ed). *Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structural determination*. CRC Press. London. 31:196-219.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002. The BCL2 family: regulators of the celular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2: 647-656.
- Cote, J., Ruiz-Carrillo, A. 1993. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261: 765-769.
- Cousar, J. 1999. The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Principles of diagnosis in: Lee G., Foerster J. Lukens J. Paraskevas F. Greer J. Rodgers G. Wintrobe's Clinical Hematology. Lippincott Williams & Wilkins USA 10^a ed. pp. 1472-1475.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:72-79. Cross, H.B. 2003. Evolution, systematics and domestication in *Sechium* and related genera (Sicyeae, Cucurbitaceae). Tesis doctoral. Columbia University. U.S.A. Páginas. 47,48.

- Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100:72-79.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Debashree, D. 2011. P53 y Cancer. Tesis de Maestría. Odisha, India. Instituto Nacional de tecnología de Rourkela. Páginas 1, 2, 3.
- Deininger, M.W.N., Goldman, J.M., Melo, J.V. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *The American Society of Hematology* 15:10-15.
- Diré, G., Lima, E., Gomes, M., Bernardo, F.M. 2003. The effect of a chayotte (*Sechium edule*) extracts (decoct and macerated) on the labeling of blood elements with technetium-99 m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an *in vitro* and *in vivo* analysis. *Pakistan Journal Nutrition* 2:221- 227.
- Domínguez, S.A. 2005. Evaluación morfológica y bioquímica de la presencia de apoptosis en varios órganos de ratón tratado con una dosis tóxica de peroxisomicina A1. Tesis de Maestría en Ciencia. Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp. 1, 5,7.
- Dubin, M., Stoppani, A. 2000. Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina*. 60: 375-386.
- Elinos-Báez, C.M., Maldonado, V., Meléndez-Zajgla, J. 2001. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México* 139: 493-499.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. A caspasa-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50.
- Estey, H. 2009. Treatment of acute myeloid leukemia. *Revista Hematologica* 74:10 -16.
- Eui-Jeon, W., Yeon-Gil, K., Min-Sung, K., Won-Deok, H., Sejeong, S., Howard, R; Sam-Yong, P., Byung-Ha, O. 2004. Structural mechanisms for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Molecular Cell* 14:531-539.
- Fan, T. J., Han, L.H., Cong, R. S., Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37: 719 - 727.
- Faujan, N.B., Alitheen, S.K., Yeap, A.M., Ali, A.H., Muhajir, F.B., Ahmad, H. 2010. Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca*

- cajuput on human myeloid (HL-60) cell line. *African Journal of Biotechnology* 9: 6387-6396.
- Fernández, De la Torre de Vega, Francisco Javier. 2009. Estudio de la apoptosis y de la expresión de proteínas involucradas en su control y en los mecanismos de vigilancia genómica, en los tumores de ovario de estirpe epitelial. Tesis de Doctorado. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Páginas. 56, 57, 58, 59 60, 61.
- Fink, S.L., Cookson, B.T. 2005. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* 73:1907-1916.
- Florence, Ng.W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P.E., Nicholson, D.W., Cromlish, J.A. 1997. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL and caspase-8 associated protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 139: 327-338.
- Fulda, S., Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811.
- Fulda, S., Debatin, K-M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.
- Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E., Debnath, J. 2008. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Molecular Biology of the Cell* 19, 797-806.
- Futuyma, D. 1988. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Massachusetts. pp. 21-23.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E; Green, D.R., Hengartner, M., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differentiation* 19: 107-120.

- García, G., González-Moles, M.A., Martínez, B.M. 2006. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. *Avances en Odontoestomatología*. 22: 263-269.
- Gerschenson, M., Houmiel, K.L., Low, R.L. 1995. Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Research* 23: 88-97.
- Gewies, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*. pp. 1-26.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T. E; Adjei, A. A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in CancerTherapy. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 55:178-194.
- Gibbs, J. B. 2000. Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science* 287:1969–1973.
- Gómez Estanislao, Cinthya Calorlina. 2010. Evaluación de la actividad antitumoral de diferentes extractos de tallo de *Parmentiera edulis* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Tesis de Maestría. Distrito Federal, México. Instituto Politécnico Nacional. pp. 6, 7,9.
- Grant, V. 1989. Especiación vegetal. Editorial Limusa, México, D. F. pp. 11-57.
- Gray, C.W., Ward, R.V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fanton, K.G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N.J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., Amegadzie, B., Davis, J.B., Dingwall, C., Livi G.P., Livi, C.L., Creasy, C.L. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *European Journal of Biochemical* 267: 5699-5710.
- Green, D.R., Reed, J.C. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Gross, A. 2001. BCL-2 Proteins: Regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life* 52: 231-236.
- Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México [GISeM]. (2008). Colecta, caracterización y conservación de *Sechium* spp. Informe en extenso. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos-SAGARPA. México, D.F. pp. 102.
- Guimaraes-Iglesias, V., Guiñon-Gil, E., Gabernet, G., Belinchón-García, M., Osuna-Sánchez, M., Casanelles, E., Comella, X.C., Yuste, V. 2012. Apoptotic DNA Degradation into Oligonucleosomal Fragments, but Not Apoptotic Nuclear

- Morphology, Relies on a Cytosolic Pool of DFF40/CAD Endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 7766-7779.
- Guppy, L.J., Gordon E.A., Nelson M. 2000. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Medical Journal* 49:27-31.
- Gutiérrez, M. 2006. Síndromes hematológicos. Su relación con las enfermedades que lo producen. ED Prado. pp. 473-491.
- Halenbeck, R., MacDonald, H., Roulston, A., Chen, T.T., Conroy, L., Williams, L.T. 1998. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Current Biology* 8: 537-540.
- Harris, C.C., Hollstein, M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *The New England Journal of Medicine* 329: 1318-1327.
- Hartt, M., Mitterstiller, A.M., Valovka, T., Breuker, K., Hobmayer, B., Bister, K. 2010. Stem cell-specific activation of an ancestral myc protooncogene with conserved basic functions in the early metazoan *Hydra*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 4051-4056.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Hernández, X. E. 1985. *Biología Agrícola*. CECSA. México. pp.62.
- Hirose, A., Ikejima, T., Gill, D. 1985. Established macrophage-like cell line synthesize interleukin-1 in response to toxic shock syndrome toxin. *Infection and Immunity* 50:765-770.
- Huang, K.J., Ku, C.C., Lehman, I.R. 2006. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proceedings of the. National. Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 8995-9000.
- Huebec, A.O., Zorming, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., Evan, G.I. 1997. Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis. *Science* 278: 1305-1309.
- Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S., Livingston, E. 2007. Screening and Detecion of Apoptosis. *Journal of Surgencies Responses*. 139: 143-156.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía). 2010. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. Pág. 3.

- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M.A., Nunez, G. 1999. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *The journal of biological chemistry* 274: 270–274.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Nunez, G. 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *The EMBO Journal* 17: 2526–2533.
- Jandl J. 1991. *Blood: Pathofisiology*. ED Blackwell Scientific Publications, Inc. 93 p.
- Jayaprakasam, B; Seeram, N.P; Nair, M.G. 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacinas from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*. 189:11-16.
- Jiang X.J., Wang, X.D. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 73: 87-106.
- Jiménez, G. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México. Páginas. 414,415,416.
- Jordán, J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22: 100-106.
- Kagan, V.E., Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Schor, N.F., Kawai, K. 2000. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Letters* 477: 1-7.
- Kantarjian, H., Dixon, D., Keating, M., Talpaz, M., Walters, R., McCredie, K., Freireich, E. 1988. Characteristics of accelerate disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 61:1441-1446.
- Karp, G. 1998. *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 746 - 671.
- Kaufmann, S. H. 1989. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Research* 49: 5870-5878.
- Kelly, L.M., Gilliland, D.G. 2002. Genetics of Myeloid Leukemias. *Genomics Hum. Genet.* 3:179-98.
- Kerr, JFR., Wyllie, AH., Currie, A.R. 1972. *Britosh Journal of Cancer* 26: 239–257.
- Knudson, A.G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10914-10921.

- Kohki, K., Hidehiro F., Hideyuki Y., Hiroko N., Yoshiyuki O., Yasuo U., Kazuhisa O., Tetsuya I., Shigekazu N. 2003. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nature Immunology* 4: 138-144.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell. Death Differentiation* 12:1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschoop, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, V., Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differentiation* 16: 3-11.
- Labardini J. 2006. Leucemia aguda mieloblástica. *Hematología actualización*. ED AMEH A.C. pp. 63-66.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Limei, Y., Mouming, Z., Jin, W., Chun, C., Bao, Y., Yueming, J., Qiangzhong, Z. 2008. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb) bark. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:122-128.
- Lin, K.H., Hsiao, G., Chwen, M., Shih, D. S. C., Sheu, J. R. 2009. Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis. *Cardiovascular research* 10: 1-11.
- Lira-Saade, R. 1996. Chayote. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research Gatersleben/International International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.57.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8461-8466.

- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Lizarbe, I.M.A. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 101: 1-33.
- Loll, B., Gebhardt, M., Wahle, E., Meinhart, A. 2009. Crystal structure of the EndoG/EndoGI complex: mechanism of EndoG inhibition. *Nucleic Acids Research* 37: 7312-7320.
- Low, R.L. 2003. Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion* 2: 225-236.
- Lugovskoy, A.A., Zhou, P., Chou, J.J., McCarty, J.S., Li, P., Wagner, G. 1999. Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell* 99: 747-755.
- Luna, C. M. 2001. Variación y domesticación de *Datura metel* L. (SOLANACEAE). Tesis de Doctorado. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Páginas. 33-34.
- Mannick, J.B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K., Gaston, B. 2001. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases, *Journal of Cell Biology* 154: 1111-1116.
- Mans, D.R.A., Da Rocha, A.B., Schwartzmann, G. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5:185-198.
- Marcé Torra, Silvia. 2006. Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides. Tesis de Maestría. Barcelona, España, Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. Páginas 7, 10, 15 25.
- Marshall, W.A., Reynolds, S., You, M., Maronpot, R.1992. Role of Protooncogene Activation in Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 98:13-24.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, C.A.A., LaFace, D.M., Green, D.R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating

- stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1545-1556.
- McMahon, Gerald. 1994. The Genetics of Human Cancer: Implications for Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*. 102:75-80.
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., Aguayo-González, A. 2006. Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación Clínica* 58: 56-70.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petenko, O., Chittander, T., Pancoska, P., Moll, V.M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* 11: 577-590.
- Miranda, E., Gutiérrez, M. 2002. Bases Moleculares de los padecimientos Hematológicos. En Rapaport S.I.: *Introducción a la Hematología*, 2ª Ed. Páginas. 24-45.
- Miret Mas, C. 2003. Alteraciones de la apoptosis como mecanismo patogénico en el lupus eritematoso sistémico. Tesis de Doctorado. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. pp. 10, 15, 22, 23.
- Monroy Vazquez, M.E. 2008. Estudio biodirigido de *Sechium edule* (jacq.) Sw. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Texcoco Estado de México. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Páginas. 12, 17, 33.
- Montaña-Figueroa, E. H., Honorato-Rosales, M.G., Ramos-Peñafiel, C., Martínez-Murillo, C. 2010. Leucemia aguda mieloide en el viejo. Valoración integral y decisión terapéutica. *Elsevier Revista Medica del Hospital General de México* 4: 252-257.
- Montesinos, J., Mayani, H. 2002. Nuevos conceptos de biología de la leucemia mieloide aguda. *Gaceta Médica de México* 138: 67-75.
- Morgan, S.J., Darling, D.C. 1993. Cultivo de células animales. *Acriba España*. pp. 159.
- Munnes, M., Patrone, G., Schmitz, B., Romeo, G., Doer, W. 1998. A 5'-CG 3'- rich region in the promoter of the transcriptionally frequently silenced RET protooncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene* 17: 2573 - 2583.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10: 108 116.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and

- cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of Natural Academy of Sciences* 95: 14681.
- Ohsato, T., Ishihara, N., Muta, T., Umeda, S., Ikeda, S., Mihara, K., Hamasaki, N., Kang, D. 2002. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of Rloops and localization in intermembrane space. *European Journal of Biochemical* 269: 5765-5770.
- Ortega-Paczka, R., Martínez-Alfaro, M.A., Rincón-Enríquez, G. 1998. Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de fitotecnía. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. pp. 93,321.
- Ospina, P.M. Muñetón, P.C.M. 2011. Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *IATREIA*. 24: 289-401.
- Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S., Yamazaki, T. 2000. Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature structural biology* 7: 658-662.
- Ouyang, H., Furukawa, T., Abe, T. 1998. The Bax gene, the promoter of apoptosis is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, an endometrium. *Clinical Cancer Research* 4:1071-1074.
- Pardo, F.J. 1998. Anatomía, patología general y especial de las neoplasias. Científico-Médica. España. Pp. 355.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X; Xue, D. 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412: 90-94.
- Perales Romero, Sonia. 2005. Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo. Tesis de Doctorado. Granada, España. Universidad de Granada. pp. 7, 11, 14, 23, 25, 26.
- Rajesh, P.R.R. Rajeshwar, P.S. 2009. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences* 8: 155-181.
- Ralph, P., Nakoinz, I. 1977. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Research* 37:546-50.

- Rivera Martínez, A. R. 2011. Efecto del extracto de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey y el híbrido H-387-07-GISem sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Páginas. 17, 18, 19, 20.
- Rojas, M., Salem, S., Berrueta, L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación de mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa* 4: 92-106.
- Roseto, A., Brenner, C. 1999. Apoptosis o la muerte celular programada. *Progresos en Medicina Pediátrica* 97:253-275.
- Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press. pp.129-144.
- Rzedowski, J. 1995. Aspectos de las plantas ornamentales mexicanas. Chapingo, Serie: Horticultura. 1: 5-7.
- Salama, M.A., Polo, N. A.E., Contreras, M. C.R., Maldonado, R.L. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de *Sechium edule*. *Revista del Colegio de Ciencias Químico-farmacéuticas*. 12:79- 82.
- Salas, M.B., Torres, M.A. 2007. Efecto de extractos de diferentes variedades de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en la proliferación de diferentes líneas tumorales. Reporte de servicio social. Carrera de Biología. FES-Zaragoza. UNAM.
- Salazar, M.M. 2009. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista colombiana de biotecnología* 11:152-166.
- Salvesen, G.S. 2002. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation* 9: 3-5.
- Sánchez, R., Arboleda, G. 2008. Mitochondria y muerte celular. *NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 6: 190-200.
- Schafer, P., Scholz, S.R; Gimadutdinow, O; Cymerman, I.A; Bujnicki, J.M; Ruiz- Carrillo, A; Pingoud, A; Meiss, G. 2004. Structural and functional characterization of

- mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 338: 217-228.
- Schlegel, R.A., Callahan, M.K., Williamson, P. 2010. The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Annals New York Academy of Sciences* 217-225.
- Schuler, M., Green, D.R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions* 29: 684:688.
- Setzer, W., Setzer, M. 2003. Plant-derived triterpenoid as potential antineoplastic agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 15: 540-556.
- Sherr, C. J. 2004. Principles of Tumor Suppression. *Cell* 116: 235–246
- Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research*. 60:3689–3695.
- Shi, Y. 2004. Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell* 117: 855–858.
- Siciliano, T., De Tomás, N., Morelli, I., Braca, A. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6510-6515.
- Singh, P.L., Lai, H. 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences* 70: 49-56.
- Soussi, T. 1996. The p53 tumour supressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Molecular Medicine Today* 52:32-37.
- Srinivasula, S., Ahmad, M., MacFarlane, M., Luo, Z., Huang, Z., Fernandes- Alnemri, T., Alnemri, E. 1998. Generation of Constitutively Active Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of Their Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 10107-10111.
- Susin, S.A., Dugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Constantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., Kroemer, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis, *Journal of experimental Medicine* 192: 571-580.

- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., Takahashi, R. 2001. A serine protease, HtrA2 is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell* 8: 613-621.
- Tallman, M., Gilliland, D. 2005. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106:1154-1163.
- Tanaka, H., Matsumura, I., Ero, S., Saton, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G., Kamakura, Y. 2002. E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Molecular Cell* 9: 1017-1029.
- Tang, H.L., Yuen, K.L., Tang, H.M., Fung, M.C. 2009. Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2009: 118 - 122.
- Taylor, R. C., Cullen, S.P., Martin, S.J. 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 231-241.
- Tiburcio F. R. 2011. Efecto de extractos crudos de especies silvestres de *Sechium* spp. (*S. chinantense* (Lira & Chiang) y *S. compositum* (J.D. Smith) C. Jeffrey) y un híbrido H- 387-07-GISem, sobre la proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Páginas. 18,19,20.
- Van Engeland, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M. 1997. Annexin V Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9.
- Van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., Vandenabeele, P. 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 487-497.
- Van Loo, G., Saelens, X., Matthijssens, F., Schotte, P., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. 2002. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differentiation* 9: 1207-121.
- Vega, A.E., Velasco, L.R., Jiménez, E.M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica* 31:97-111.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 15: 2922-2933.

- Weinberg, R. A. 1996. How cancer arises. *Scientific American* 275:62-70.
- White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & development* 10: 1-15.
- Widlak, P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochimica Polonica* 47: 1037-1044.
- Widlak, P., Garrard, W.T. 2005. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry* 94: 1078-1087.
- Wu, S.L., Li, C.C., Chen, J.C., Chen, Y.J., Lin, C.T., Ho, T.Y., Hsiang, C.Y. 2009. Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G. *Journal of Biomedical Science* 16:614-625.
- Wyllie, A.H. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *International Review Cytology* 68: 251-306.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. 1984. Chromatin Cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *The Journal Pathology* 142:66-67.
- Xal. 2001. Mapa de ubicación de colectas de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., en el Estado de Veracruz, México. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology* 39:1045-1053.
- Yerbes-Cadenas, Rosario. 2010. Papel fundamental de cFLIP en el control de la apoptosis en células epiteliales de mama. Tesis de Doctorado. Granada, España. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa. pp. 8, 12, 15, 19, 26.
- Yocota, J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Life Science Carcinogenesis* 21:497-503.
- Yokota, J., Sugimura, T. 1993. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *The FASEB Journal* 7: 920-925.

- Zamzami, N., Brenner, C., Manzo, I., Susin, S.A., Kroemer, G. 1998. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16:2265-2282.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Development* 12: 2424-2433.
- Zoratti, M., Szabo, I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1241: 139-176.
- Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., Formell F. 2002. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters* 175: 17-25.