



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Mecanismos de inhibición de la proliferación inducida por  
extractos de *Sechium* spp. en la línea celular HeLa**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**  
FES ZARAGOZA

**COMITÉ TUTOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ**  
FES ZARAGOZA

**DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**  
PROGRAMA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Mecanismos de inhibición de la proliferación inducida por  
extractos de *Sechium* spp. en la línea celular HeLa**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**

**FES ZARAGOZA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ**

**FES ZARAGOZA**

**DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**

**PROGRAMA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2014**

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Subdirector de Certificación y Control Documental  
Dirección General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del 06 de octubre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ** con número de cuenta 300010167 del posgrado en Ciencias Biológicas con la tesis titulada **"MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR EXTRACTOS DE *Saccharum* spp EN LA LÍNEA CELULAR HeLa"**, bajo la dirección del Tutor(a) Principal: **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO** :

Presidente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO  
Vocal: DR. JORGE CADENA BIQUEZ  
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL ROTO CRUZ  
Suplente: DR. BENNY WEISS STEIDER  
Suplente: DR. ALBERTO MCENROY GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Unversitaria D.F. a 21 de noviembre de 2014.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



C.C.P. Expediente de (a) interesado (s)

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la UNAM por permitirme realizar mi proyecto con todo el apoyo brindado.

Con el apoyo financiero del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF PICSA 10-156), el Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM), el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA-SINAREFI), el programa PAPIIT (IN220814). También se contó con el apoyo del Programa de Becas Nacionales para estudios de Maestría por el CONACYT (270102).

Agradecimiento al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, quien fue mi director de tesis y a la Dra. Isabel Soto Cruz y el Dr. Alberto Monroy García, miembros del comité tutor por el apoyo y asesoramiento durante todo el proyecto.

## Agradecimientos

Cuando es cuestión de agradecer hay una gran lista de personas que me han apoyado en todo mi camino, cada uno en alguna forma muy particular, pero de igual modo importante desde que son parte de mi vida, por eso reconozco que toda las personas a mi alrededor han construido mi vida. Gracias a todos y cada uno de ustedes y que la vida les regrese todo ese amor y apoyo que me brindaron y que lo siguen haciendo.

A mi madre Socorro Martínez que me da el ejemplo de seguir adelante ante todo.

A mi novio Ricardo Mejía que me abraza con su enorme corazón y paciencia, que sabe escucharme y me fortalece para lograr los sueños que tenemos, por tu amor.

A mis hermanos que con sus locuras me demuestran lo extraña que es la vida.

Al Dr. Edelmiro por su apoyo y guía en muchos aspectos desde que llegue a su laboratorio.

A Itzen y Lupita por ser mis amigas y un gran equipo de trabajo que siempre me animan y apoyan para lograr los objetivos, así como siempre encontrar el lado divertido a todo.

A Edgar Ledesma, Luis, Leonel, Angel, Aide, Ignacio y Anita porque siempre he contado con su apoyo y que los logros son de todos por ser un gran equipo, ellos hacen del laboratorio un lugar tan genial, somos una familia.

A los miembros del jurado: el Dr. Jorge Cadena Iñiguez, el Dr. Benny Weiss Steider y el Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, FES-Zaragoza, UNAM.

Agradecimiento al apoyo brindado por la Biól. Guadalupe Gómez como responsable de la unidad de Citometría de flujo de la UMIEZ.

Y con mención del apoyo de la M. en C. Itzen Aguiñiga en ésta investigación.

Al guerreo incansable... Pedro Arturo



## Contenido

Introducción .....	17
Cáncer .....	17
Cáncer de cérvix .....	20
Tratamiento contra el cáncer .....	21
Mecanismos de inhibición de la proliferación .....	22
Senescencia .....	23
Necrosis .....	24
Apoptosis .....	25
Vía de señalización extrínseca .....	28
Vía de señalización intrínseca .....	31
Alternativas de origen natural para el cáncer .....	33
<i>Sechium</i> P. Browne .....	34
<i>Sechium chinantlense</i> Lira & F. Chiang .....	37
Antecedentes .....	38
Planteamiento del problema .....	39
Hipótesis .....	39
Objetivo general .....	40
Objetivos particulares .....	40
Método .....	41
Obtención del extracto .....	41
Cultivo celular .....	42
Ensayos de proliferación celular .....	42

Evaluación de la viabilidad y número celular .....	43
Evaluación del porcentaje de cuerpos apoptóticos .....	43
Concentración de inhibición media (IC50) .....	44
Evaluación de la translocación de fosfatidilserina con Anexina V-PE.....	44
Evaluación del ciclo celular por incorporación de yoduro de propidio.....	45
Evaluación de p53 y caspasa-3 activos por citometría de flujo.....	46
Evaluación de citocromo-c citoplasmático en lisado celular por ELISA .....	47
Evaluación de caspasa 8 activa por ensayo colorimétrico .....	48
Evaluación de la fragmentación del ADN por electroforesis en gel de agarosa.....	48
Manejo de datos .....	49
Resultados.....	50
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la proliferación celular de la línea HeLa y HaCaT...	50
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la viabilidad celular de la línea HeLa y HaCaT .....	54
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea HeLa y HaCaT.....	55
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la fragmentación de ADN de la línea celular HeLa .	56
Efecto de <i>S. chinantlense</i> en el ciclo celular de la línea HeLa y HaCaT.....	57
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la activación de p53 en células HeLa y HaCaT .....	61
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la translocación de fosfatidilserina en las células HeLa y HaCaT .....	63
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la activación de caspasa-8 en células HeLa y HaCaT .....	65
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la liberación de citocromo-c en las células HeLa y HaCaT.....	66
Efecto de <i>S. chinantlense</i> sobre la activación de caspasa-3 en células HeLa y HaCaT .....	67

Discusión ..... 70

Conclusiones ..... 77

Literatura citada ..... 78

## Lista de figuras y cuadros

Cuadro 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre los procesos de necrosis y apoptosis. Página **25**.

Cuadro 2. Factores inductores de la apoptosis. Página **27**.

Figura 1. Vía extrínseca de la apoptosis. Página **30**.

Figura 2. Vía intrínseca de la apoptosis. Página **32**.

Figura 3. Variación de color de frutos de *Sechium chinantlense*. Página **37**.

Figura 4. Efecto de cisplatino sobre la proliferación de las células HeLa y HaCaT. Página **50**.

Figura 5. Efecto del extracto *S. chinantlense* sobre la proliferación de las células HeLa y HaCaT. Página **51**.

Tabla 1. Concentración de inhibición media de la proliferación (IC<sub>50</sub>) del extracto *S. chinantlense* y cisplatino sobre la proliferación de las líneas celulares HeLa y HaCaT.

Página **52**.

Figura 6. Número celular de la línea HeLa a diferentes tiempos con la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino. Página **53**.

Figura 7. Número celular de la línea HaCaT a diferentes tiempos con la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino. Página **53**.

Tabla 2. Viabilidad celular de las líneas HeLa y HaCaT con la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino en las líneas celulares HeLa, a diferentes tiempos. Página **54**.

Tabla 3. Formación de cuerpos apoptóticos (%) inducidos por la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino en las líneas celulares HeLa y HaCaT, a diferentes tiempos.

Página **55**.

Figura 8. ADN fragmentado proveniente de células HeLa con las IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino. Página **56**.

Figura 9. Evaluación de la sincronía en el ciclo celular en la línea HeLa. Página **57**.

Figura 10. Evaluación del ciclo celular en la línea HeLa con colchicina. Página **58**.

Figura 11. Efecto de las IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino sobre el ciclo celular de la línea HeLa. Página **59**.

Figura 12. Efecto de las IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino sobre el ciclo celular de la línea HaCaT. Página **60**.

Figura 13. Evaluación de p53 activa en células HeLa con las IC<sub>50</sub> de cisplatino y extracto de *S. chinantlense*. Página **61**.

Figura 14. Evaluación de p53 activa en células HaCaT con las IC<sub>50</sub> de cisplatino y extracto de *S. chinantlense*. Página **62**.

Figura 15. Efecto las IC<sub>50</sub> de B) *S. chinantlense* y C) cisplatino, sobre la translocación de fosfatidilserina (Anexina-V) en células HeLa, tratadas por 72 horas A) control. Página **63**.

Figura 16. Efecto las IC<sub>50</sub> de B) *S. chinantlense* y C) cisplatino, sobre la translocación de fosfatidilserina (Anexina-V) en células HaCaT, tratadas por 72 horas A) control. Página **64**.

Figura 17. Actividad relativa de caspasa-8 en las líneas celulares HeLa y HaCaT tratadas con las IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino. Página **65**.

Tabla 4. Concentración citoplasmática de citocromo-c en células HeLa y HaCaT tratadas con las IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino. Página **66**.

Figura 18. Evaluación de caspasa-3 activa en células HeLa con las IC<sub>50</sub> de cisplatino y extracto de *S. chinantlense*. Página **67**.

Figura 19. Evaluación de caspasa-3 activa en células HaCaT con las IC<sub>50</sub> de cisplatino y extracto de *S. chinantlense*. Página **68**.

Tabla 5. Resumen de las evidencias de apoptosis en las líneas celulares HeLa y HaCaT, por efecto de las IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y del antineoplásico cisplatino. Página **69**.

## Resumen

### **Mecanismos de inhibición de la proliferación inducida por extractos de *Sechium* spp. en la línea celular HeLa**

A nivel mundial el cáncer es la primera causa de muerte, y en particular el cáncer cérvico-uterino continúa siendo uno de los que más se presenta en mujeres en nuestro país y es la tercera causa de muerte por cáncer. Aun a pesar de los tratamientos actuales, éstos suelen causar fuertes efectos secundarios además de no ser selectivos entre células cancerígenas y normales. Por lo que se ha incrementado la necesidad de fortalecer las investigaciones de tratamientos alternativos o complementarios, en este sentido las plantas siguen siendo fuente para la obtención de agentes medicinales. El extracto de *Sechium chinantlense* especie endémica de México, tiene actividad antiproliferativa sobre varias líneas celulares tumorales y leucémicas, incluso induce la translocación de fosfatidilserina y la fragmentación del ADN en líneas celulares leucémicas, sin embargo en la línea celular HeLa, proveniente de cáncer de cérvix, sólo se ha reportado la inducción de cuerpos apoptóticos. El objetivo del presente trabajo es identificar el mecanismo de inhibición de la proliferación inducido por el extracto de *S. chinantlense* sobre las células HeLa.

Los resultados muestran que el extracto de *S. chinantlense* inhibe la proliferación celular de HeLa y HaCaT (una línea celular de queratinocitos humanos), en forma dependiente de la concentración de forma similar a un antineoplásico regular como el cisplatino. Interesantemente, *S. chinantlense* y cisplatino reducen la viabilidad e inducen

la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN, con translocación de fosfatidilserina en HeLa, pero esto solo el cisplatino lo hace en HaCaT. Por otro lado, en cuanto al mecanismo de inducción de apoptosis encontramos que en células HeLa pero no HaCat, *S. chinantlense* induce la activación de p53, caspasa-3, y liberación de citocromo-c pero solo el cisplatino induce la activación de caspasa-8 en HeLa.

Todos estos eventos sugieren que el extracto de *S. chinantlense* inhibe la proliferación de células HeLa mediante la inducción de apoptosis por la vía intrínseca, de forma similar al antineoplásico cisplatino. Sin embargo los resultados también muestran que el extracto presenta cierta selectividad sobre las células no tumorales.

## **Abstract**

### **Mechanisms of inhibition of cell proliferation induced by *Sechium spp* extracts on HeLa cell line**

Worldwide, cancer is the leading cause of death, and cervical cancer remains one of the most frequently cancer that occurs in women in Mexico and is the third leading cause of cancer death. Current treatments often cause severe side effects because they not being selective between cancerous and normal cells. As has increased the need to strengthen the research of alternative or complementary treatments, the plants in this regard remain a source for obtaining medicinal agents. *Sechium chinantlense* extract endemic plant of Mexico, has antiproliferative activity against several tumor and leukemia cell lines, even induces translocation of phosphatidylserine and DNA fragmentation in leukemic cell lines, but in the HeLa cell line, derived of cervical cancer, has only been reported induction of apoptotic bodies. The aim of this study is to identify the mechanism of inhibition of proliferation induced by *S. chinantlense* extract on HeLa cells.

The results show that the extract of *S. chinantlense* inhibited cell proliferation of HeLa cell line and HaCaT a cell line of human keratinocytes, in a concentration dependent manner similar to a regular antineoplastic as Cisplatin. Interestingly, *S. chinantlense* and cisplatin reduce the viability and induce the formation of apoptotic bodies and fragmentation of DNA, translocation of phosphatidylserine in HeLa, but this only makes cisplatin in HaCaT. On the other hand, the mechanism of induction of apoptosis in HeLa



cells we found that *S. chinantlense* as Cisplatin, induces p53 and caspase-3 activation, and release of cytochrome-c but only cisplatin induces activation of caspase 8 in HeLa.

All of these events suggests that *S. chinantlense* extract inhibited the proliferation of HeLa cells by intrinsic pathway of apoptosis induction, by similar way to antineoplastic Cisplatin. However, the results also show that the extract has some selectivity on non-tumor cells.

## **Introducción**

### **Cáncer**

El cáncer es un problema de salud pública creciente a nivel mundial que afecta a personas de todas las edades y que es producido por diversos cambios en la conducta de las células que surgen por modificaciones en la información genética, debido a lo cual éstas células proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva destruyendo tejidos y órganos normales (Collado *et al.*, 2005). Tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos, como son, 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 (Huntly *et al.*, 2005). El cáncer se caracteriza principalmente por seis cualidades que se manifiestan en el desarrollo del tumor. Incluyen la constante señalización de proliferación, evasión de señales de supresión de crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis y la invasión de otros tejidos por metástasis (Hanahan *et al.*, 2000). El avance en los últimos años ha sumado dos nuevas características en las células cancerosas, la reprogramación de su energía metabólica y la evasión del sistema inmune (Hanahan *et al.*, 2011).

Los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento celular, asegurando la homeostasis para mantener el funcionamiento de dicho tejido. La activación de las señales de proliferación se da principalmente por factores de crecimiento que se unen a receptores de membrana, que emiten una cascada de señalización regulando el ciclo celular. Las células cancerosas obtienen su capacidad proliferativa produciendo factores de crecimiento para sí mismas (estimulación autócrina) o enviando señales para estimular células normales adyacentes y de esta manera obtener factores de crecimiento (estimulación parácrina). Además, las células cancerosas eluden programas que regulan negativamente la proliferación celular, donde intervienen los genes supresores de tumor. Se ha descubierto que los genes supresores de tumor se encuentran de manera inactiva en varios tipos de cáncer (Hanahan *et al.*, 2000).

Las células tumorales presentan estrategias para limitar o evitar la apoptosis. En la actualidad se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental para el desarrollo del cáncer, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis, metástasis y en la respuesta a los tratamientos antineoplásicos (Alfaro *et al.*, 2000). Los mecanismos que utilizan las células cancerosas para evadir la apoptosis es la pérdida de la función de p53, incremento de la expresión de proteínas reguladoras antiapoptóticas en la mitocondria o regulando factores apoptóticos (Hanahan *et al.*, 2000).

El cáncer se clasifica generalmente según el origen de las células donde surge y se agrupan en: 1) carcinomas; aquellos cuyo origen son las células epiteliales; 2) sarcomas; aquellos cuyo origen son las células de tejido conectivo y las células musculares (tejidos blandos), y 3) aquellos que no se ajustan a ninguna de las anteriores categorías y que incluyen la leucemia, linfomas y los tumores del sistema nervioso (Jiménez *et al.*, 2003).

Actualmente, el cáncer sigue en aumento, en gran parte debido al envejecimiento y el crecimiento de la población mundial y por otra parte a una creciente adopción de comportamientos dietéticos y conductuales que causan cáncer, entre ellos índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y de alcohol. Los países que presentan mayor mortandad son los que se encuentran en vías de desarrollo y la supervivencia de cáncer tiende a ser mayor en los países desarrollados, debido a un mayor acceso a los servicios de salud y a un diagnóstico oportuno (Jemal *et al.*, 2011).

De acuerdo a la OMS, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones. Los tipos de cáncer que más muertes causan cada año son los de pulmón, estómago, hígado, colon y en la mujer el de mama y de cérvix. Aproximadamente un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países de ingresos medios y bajos. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030 (OMS, 2014).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), dicha enfermedad es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. En 2012 del total de defunciones, 13% se debieron a algún tumor y de éstas, 93.5% por neoplasias malignas de las cuales la principal causa de defunciones por tumor maligno es el de órganos digestivos (33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil). Por sexo el comportamiento es diferente, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte ya que fallecen 15.38 de cada 100 mil (INEGI, 2014).

### **Cáncer de cérvix**

El cáncer cérvico-uterino o de cérvix es un tumor maligno de las células del cuello uterino. Se inicia como una lesión displásica o intra-epitelial cervical, afectando principalmente la unión de los epitelios escamoso y columnar correspondientes al epitelio del exocérvix y endocérvix, respectivamente. En la mayoría de los casos esta lesión intra-epitelial evoluciona en forma paulatina a carcinoma *in situ*, con la posibilidad posterior de romper la membrana basal y así invadir el estroma adyacente y convertirse en un carcinoma micro invasor (nivel de invasión menor de 5 mm) con menor probabilidad de comprometer vasos linfáticos. En esta evolución este tipo de tumor puede continuar su infiltración, denominándose carcinoma invasivo (Ortiz *et al.*, 2004). El virus de papiloma humano (VPH) es un virus simple, de doble cadena de ADN, sin envoltura. Se han identificado más de 100 genotipos de éste virus, que causan un

diverso rango de lesiones epiteliales, donde cerca de 35 tipos de VPH se identifican en lesiones benignas y malignas del tracto ano-genital, tanto en hombres como en mujeres; además, 15 de estos tipos virales se asocian en diferente grado al cáncer de cérvix (Borruto *et al.*, 2012; Lizano *et al.*, 2009). Dos tipos de VPH (genotipo 16 y 18) se asocian al 70% de cáncer de cérvix y lesiones cervicales precancerosas (OMS, 2013). El cáncer de cérvix es el segundo de tipos de cáncer que afecta a la mujer a nivel mundial, con un aproximado de 530 000 nuevos casos cada año y la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres. Cada año, de las más de 270 000 muertes por cáncer de cérvix que se presentan mundialmente, el 85% se produjeron en países en vías de desarrollo. Actualmente se ha desarrollado la vacuna contra el VPH 16 y 18 para prevenir la infección, que pretende disminuir de forma importante la incidencia del cáncer. Sin embargo, dado que su efecto se manifestará a largo plazo y es posible el brote de otros tipos oncogénicos de virus entre ellos los de VPH, es necesario no bajar la guardia en la investigación dirigida a la mejora del diagnóstico, pronóstico y tratamientos eficaces (Lizano *et al.*, 2009; OMS, 2013).

### **Tratamiento contra el cáncer**

El desarrollo de tratamientos para el cáncer ha ido incrementando en los últimos años. Se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerígenas. Sin embargo, muchos de los medicamentos nuevos obtenidos por síntesis química no tienen el efecto esperado en la clínica, esto debido a la complejidad de la enfermedad. Los tratamientos que existen para el cáncer se basan principalmente en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Actualmente, el principio de

acción de la mayoría de estos tratamientos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerígena en comparación con el de las células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células normales que crecen y se dividen rápidamente, como las de la sangre y la mayoría de los epitelios (Schlaepfer *et al.*, 2010). La quimioterapia y la radioterapia, son costosas y causan muchos efectos secundarios, incluyendo efectos menores tales como vómitos, alopecia, diarrea, estreñimiento, y efectos de mayor riesgo tales como mielosupresión, toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal. Todos estos efectos secundarios reducen la calidad de vida a los pacientes. La cirugía puede causar deficiencias funcionales y dolor, además de no garantizar la erradicación completa del cáncer. Por lo tanto, hay una necesidad de diseñar terapias alternativas contra el cáncer, más efectivas, selectivas y de menor toxicidad de los que actualmente se tienen en uso (Alonso-Castro *et al.*, 2011).

### **Mecanismos de inhibición de la proliferación**

Todas las células de un organismo multicelular complejo están sometidas a un riguroso control que abarca tanto su potencial de proliferación y diferenciación, como la muerte celular por senescencia o apoptosis. Cuando existen desequilibrios de este control conducen a trastornos de proliferación y junto a ciertas mutaciones convierten genes reguladores de proliferación y diferenciación en oncogenes desencadenantes de cáncer. Las mutaciones constituyen el principal riesgo de daño genómico en células en división. El genoma continuamente es afectado por influencia del entorno, por subproductos del metabolismo oxidativo y en el caso de las células que se dividen, por

errores en la replicación del ADN y la mitosis. En función del tipo y el grado del daño, las células pueden intentar repararlo o morir. Si estos cambios confieren ventajas para el crecimiento, la supervivencia o provocan que el genoma se transforme en inestable y de esta forma en hiper mutable, entonces se establecen condiciones para el desarrollo del cáncer (Pardo *et al.*, 2005).

## **Senescencia**

El concepto de senescencia celular fue propuesto por Leonard Hayflick como: “la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de células que se mantienen en un estado metabólicamente activo necesario para su supervivencia” (Martínez, 2009). La senescencia puede ser causada por varios estímulos como el acortamiento de telómeros, daño al ADN, expresión de oncogenes, entre otros (Hampel *et al.*, 2005). Se conoce que estos estímulos desencadenan el fenómeno de senescencia celular por medio de dos vías de señalización: vía p53 y vía pRB (Vicencio *et al.*, 2008). En condiciones normales la proteína p53 que no es activada, es degradada por el complejo MDM2, pero cuando existe daño al ADN se activa la vía de señalización, originando que la proteína p53 active la proteína p21 la cual es inhibidora de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI), y ésta puede frenar el ciclo celular. En la vía de la proteína pRB (Retinoblastoma) es activada por la proteína p16 después de estrés celular o daño al ADN y luego se une a miembros de la familia de factores transcripcionales E2F, los cuales regulan el ciclo celular (Vicencio *et al.*, 2008).



Las células senescentes revelan sorprendentes cambios en expresión de genes relacionados directamente con las vías de señalización ya sea de manera positiva, con las proteínas p53 y p16, o de manera negativa inhibiendo genes que codifican para proteínas que estimulan o facilitan el proceso del ciclo celular, como por ejemplo histonas implicadas en el proceso de replicación, c-FOS, ciclina A, ciclina B y PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Campisi *et al.*, 2007).

## **Necrosis**

De los tipos más comunes de muerte celular, se encuentran la necrosis y apoptosis; aunque estos dos tipos de muerte tienen algunas características en común, presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica (Cuadro 1), de tal forma que es posible identificar cada mecanismo (Jordán, 2003). La necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía, presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática (Zhivotovsky *et al.*, 2001), 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 (Fink *et al.*, 2005). Sin embargo, datos recientes indican que puede ser una respuesta fisiológica normal de eventos regulados, que se produce cuando el daño del tejido es letal, o se produce una muerte accidental, considerándose muerte “patológica” de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o una condición patológica que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y resistencia; las células se hinchan, se deterioran sus estructuras y se

paralizan funciones críticas (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2014). Se caracteriza morfológicamente por una rápida permeabilización de la membrana plasmática, que ocasiona un aumento en el volumen celular, hinchazón de organelos, lisis de la membrana celular y pérdida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Kroemer *et al.*, 2005).

	<b>Necrosis</b>	<b>Apoptosis</b>
Condiciones	Patológica	– Fisiológica – Alteraciones patológicas
Tamaño celular	Edema	Retracción
Membrana citoplasmática	Lisis, rotura	Expresión de glucoproteínas
Mitocondria	Hinchazón, rotura	Funcional
Degradación del ADN	Aleatoria	Ordenada
Requerimiento energético	No	Sí
Reacción inflamatoria	Sí	No

Cuadro 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre los procesos de necrosis y apoptosis. Tomado y modificado de Jordán (2003).

## **Apoptosis**

En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis celular mantiene el estado de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación y su tiempo de vida, de acuerdo con las necesidades del organismo, eliminando aquellas 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 *et al.*, 2003), por no ser aleatoria, sino que se trata de un proceso activo genéticamente, en el que las células están destinadas a morir en un tiempo

determinado (Jordán, 2003). La apoptosis se puede definir como: un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula (Elmore, 2007).

La ejecución de la apoptosis está asociada a una serie de características morfológicas y cambios bioquímicos (Cuadro 1); relacionados con la activación de una cascada de caspasas, así como nucleasas que degradan el ADN, condensación nuclear y citoplasmática, pérdida del potencial mitocondrial, exposición del fosfolípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y la aparición de cuerpos apoptóticos, de manera que la célula en proceso de muerte se fragmente y sea rápidamente fagocitada por macrófagos o células adyacentes. De esta forma, las células muertas son rápidamente eliminadas y se evita la liberación de material citoplasmático asociado a una respuesta inflamatoria (Pardo *et al.*, 2005), sin dejar cicatrices en los tejidos (Jordán, 2003).

Este proceso es dinámico y aparecen múltiples eventos con diferentes características dependiendo del momento en que se encuentre la célula. Existen estímulos clave que activan proteínas para desencadenar la cascada apoptótica tales como, las anomalías en la replicación o transcripción del ADN en cada ciclo celular, mutaciones por agentes tóxicos, químicos y/o físicos provenientes del exterior (Cuadro 2) (Jordán, 2003), así como, la pérdida del contacto con la matriz extracelular y la deprivación de factores de crecimiento, los cuales son estímulos apoptóticos potentes (Alfaro *et al.*, 2000) y pueden activar una de las dos vías de señalización, la intrínseca o la extrínseca.

Fisiológicos	Asociados al daño celular	Terapia	Toxinas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF</li> <li>- Ligando de Fas</li> <li>- TGF-beta</li> <li>- Neurotransmisores (glutamato, dopamina)</li> <li>- Ausencia de factores de crecimiento</li> <li>- Pérdida de fijación de la matriz</li> <li>- Ca<sup>2+</sup></li> <li>- Glucocorticoides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Golpe térmico</li> <li>- Infección viral</li> <li>- Toxinas bacterianas</li> <li>- Oncogenes: myc, rel, E1A</li> <li>- Factores de transcripción: p53</li> <li>- Linfocitos T citotóxicos</li> <li>- Agentes oxidantes</li> <li>- Radicales libres</li> <li>- Retirada de nutrientes-antimetabólicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quimioterapéutica (cisplatino, doxorubicina, pleomycina, cyticina arabinosida, metotrexato, vincristina)</li> <li>- Radiación <math>\gamma</math></li> <li>- Radiación UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etanol</li> <li>- Betaamiloide</li> <li>- Veratridina</li> <li>- 6-OHDA</li> <li>- 3-NP</li> <li>- Metanfetamina</li> </ul>

Cuadro 2. Factores inductores de la apoptosis. Tomado y modificado de Jordán (2003).

La proteína **p53** es un factor de transcripción que se activa en respuesta al daño en el ADN (Jordán, 2003) y estimula la apoptosis cuando hay un daño muy importante y el ADN no puede ser reparado. Regula la transcripción de genes en la cascada apoptótica, entre los cuales están Bax y Bcl-2, que son importantes en la vía intrínseca; en la cual p53 puede interaccionar directamente con Bcl-2 y Bcl-XL, liberando moléculas pro apoptóticas como Bak y Bax que se encuentran unidas a Bcl-2 y Bcl-XL, las cuales pueden inhibir la liberación del citocromo-c, de tal forma que cuando Bak y Bax quedan libres pueden inducir los cambios mitocondriales que liberan factores apoptogénicos de la mitocondria (Mihara *et al.* , 2003; Aljabri, 2006). EL gen p53 también puede inducir apoptosis por la activación transcripcional de genes pro apoptóticos como Noxa, Puma, Bax, p53AIP, Apaf-1 y PERP, así como por represión transcripcional de Bcl-2 y las IAP's (Wu *et al.*, 2009). La intensidad y cinética de expresión de estos genes depende de los niveles de p53 y del tipo de estrés celular inducido, ya que los genes inducidos por p53 críticos para su acción apoptótica pueden variar según el contexto celular. Un

ejemplo sería en la ruta extrínseca 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 3 proteínas transmembranales que son: Fas, DR5 y PERP (Perales, 2005). El entendimiento de las vías de señalización que regulan el programa de apoptosis ha revelado como ésta se desencadena en respuesta a varias tensiones fisiológicas, pudiendo establecer dos grandes vías, el programa apoptótico extrínseco (la señalización comienza fuera de la célula) y el programa apoptótico intrínseco (la señalización parte del interior de la célula), con lo cual, la célula es progresivamente fagocitada por células especializadas (Hanahan *et al.*, 2000).

### **Vía de señalización extrínseca**

La vía de señalización extrínseca que inicia la apoptosis involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales, los cuales implican receptores de muerte que son miembros de la super familia de genes receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Los miembros de la familia del receptor de TNF comparten dominios extracelulares similares ricos en cisteína y tienen un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos llamada "dominio de muerte" (Elmore, 2007); el cual desempeña un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Hasta la fecha, los ligandos mejor caracterizados y los receptores de muerte correspondientes incluyen FasL/FasR

(Fatty acid synthetase Receptor), TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 (Death Receptor-4) y Apo2L/DR5 (Rubio-Moscardo *et al.*, 2005).

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis se caracteriza mejor con los modelos de FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR1. En estos modelos hay agrupamiento de los receptores y la unión homóloga con el ligando trimérico. Tras la unión del ligando, ciertas proteínas adaptadoras citoplasmáticas son “reclutadas” exhibiendo dominios de muerte que se unen a los receptores correspondientes. La unión del ligando de Fas a su receptor (Fas), da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD (Fas-Associated Death Domain) y la unión del ligando TNF al receptor de TNF, resulta en la unión de la proteína adaptadora TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) y con el reclutamiento de FADD y RIP (Wajant, 2002). Posteriormente FADD se asocia con la procaspasa-8 a través de la dimerización del dominio causante o inductor de muerte. En este punto se forma un complejo de señalización inductor de la muerte (DISC), lo que resulta en la activación auto-catalítica de la procaspasa-8 (Elmore, 2007). Estas moléculas activarán a las caspasas iniciadoras -8 y -10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico (Huerta *et al.*, 2007; Martínez, 2009) (Figura 1).

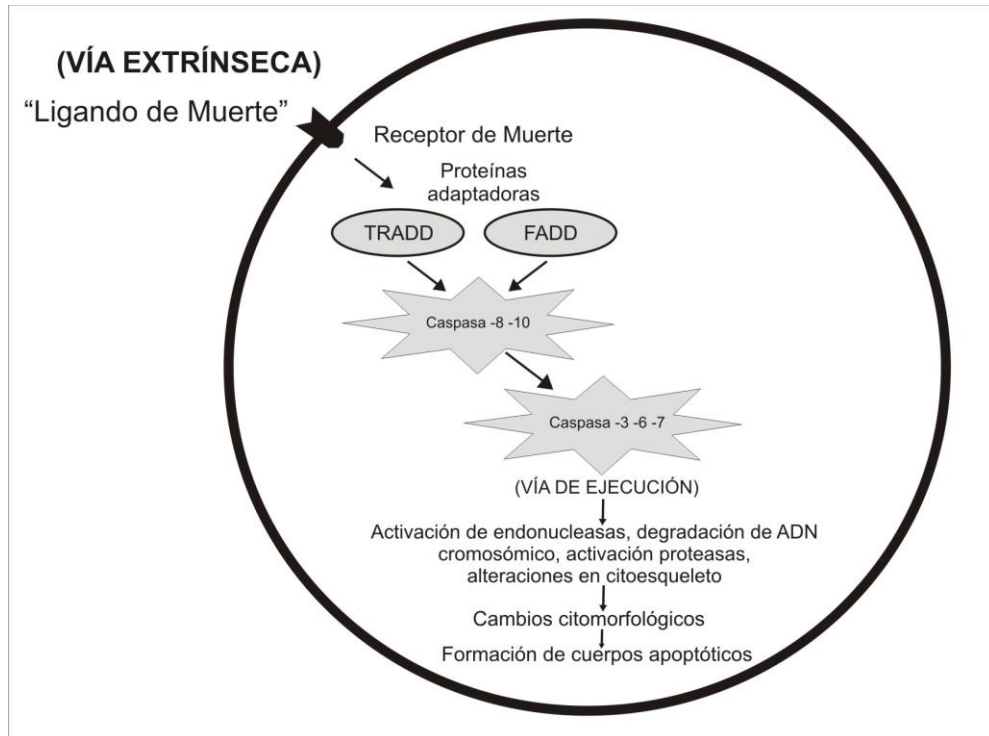


Figura 1. Vía extrínseca de la apoptosis. Tomado y modificado de Martínez (2009).

## Vía de señalización intrínseca

En la vía de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales en la membrana mitocondrial, principalmente por la apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembranal, lo que conlleva una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal (Elmore, 2007). Estos componentes liberados están constituidos principalmente por:

- i. Citocromo-c. La liberación de citocromo-c, activa la proteína Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) y la procaspasa-9, además de ATP, estableciendo un complejo proteico denominado “apoptosoma”, el cual activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis (Huerta *et al.*, 2007; Martínez, 2009).
- ii. Smac/Diablo (Smac: second mitochondrial activator of caspasas; DIABLO: direct IAP binding protein with low pI) y la serín-proteasa HtrA2/Omi (High-temperature requirement). Estas proteínas promueven apoptosis por inhibición de IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis) como cIAP1, cIAP2 y XIAP (Huerta *et al.*, 2007; Martínez, 2009), las cuales tienen la habilidad de inhibir a las caspasas activas; por lo cual, Smac/Diablo previene la inactivación de las caspasas.
- iii. Factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD), que se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN (Elmore, 2007).



Las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser apoptótica o anti-apoptótica, que a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk (Elmore, 2007; Martínez, 2009) (Figura 2).

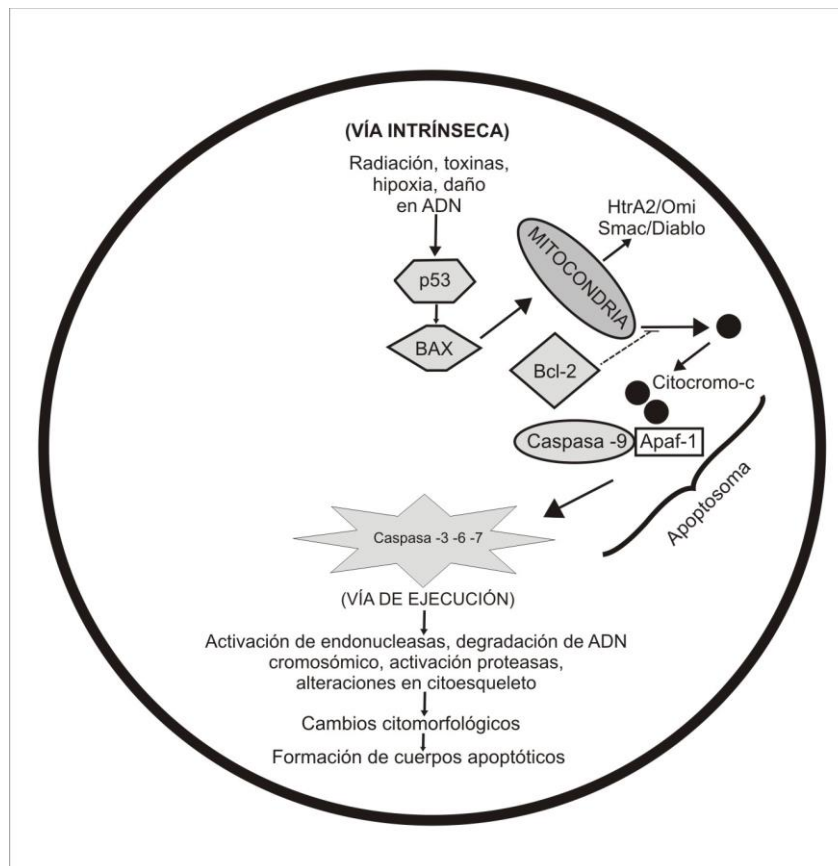


Figura 2. Vía intrínseca de la apoptosis. Tomado y modificado de Martínez (2009).

Un evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática, tal es el caso de la distribución de la fosfatidilserina, la cual es un fosfolípido que se encuentra orientado hacia el interior de la célula (Van Engeland *et al.*, 1996). Se ha observado que la **translocación de fosfatidilserina** desde la cara interna de la membrana hacia la externa, es debido a la acción de proteínas de membrana translocasas, ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas (Zhivotovsky *et al.*, 2001) como un fenómeno efectivo para la detección de una célula apoptótica (Elmore, 2007).

### **Alternativas de origen natural para el cáncer**

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 para la obtención de agentes medicinales (Setzer *et al.*, 2003). En este sentido de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos, aproximadamente el 67% de éstos son derivados en una u otra forma de fuentes naturales, incluyendo plantas (Vega *et al.*, 2006), y se estima que en el mundo se utilizan unas 10,000 especies vegetales como medicinal, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional, de las cuales, se emplea sólo un número relativamente reducido (Cañigüeral *et al.*, 2003). Este retorno progresivo hacia el uso de los productos de origen natural en la terapéutica, ha sido estimulado por el regreso hacia lo natural, hecho que se ha

producido en forma genérica en la sociedad. El descubrimiento de efectos adversos de fármacos de síntesis química, sumado al mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados, ha conducido al desarrollo de nuevos métodos analíticos puestos a disposición del control de calidad y al desarrollo de nuevas formas de preparación y administración para su uso terapéutico (Cañigual *et al.*, 2003).

El valor medicinal de las plantas está dado por sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios (Bye *et al.*, 1992), que producen efectos fisiológicos y que en la naturaleza tienen la función de defensa contra los herbívoros (Tallamy *et al.*, 1989), los cuales a menudo muestran 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 (Bartalis *et al.*, 2005).

### ***Sechium* P. Browne**

Dentro de las plantas abordadas recientemente se encuentran diferentes genotipos del género *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae). Muchas especies de ésta familia tienen su centro de origen y domesticación en Mesoamérica y representan valiosos intereses por su diversidad e integración a la dieta alimentaria y aspectos de la medicina tradicional (Ortega *et al.*, 1998). 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*). Su distribución va desde

México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996; Cross, 2003), y *Sechium edule* (Jacq.) Sw., por su alto grado de domesticación y usos, es la especie que cuenta con mayor diversidad biológica (Ortega *et al.*, 1998). Lira-Saade en 1996, realizó una recopilación de datos donde describe la taxonomía, el origen, los usos, la ecología, las características biológicas y agronómicas, áreas de producción y consumo de *S. edule* y la descripción de *S. hintonii*, *S. compositum* y *S. chinantlense*. Teniendo como una peculiar característica que los frutos silvestres son de sabor amargo y los de plantas domesticadas no (Lira-Saade *et al.*, 1999).

*Sechium edule* (Jacq.) Sw., es endémica de México (Lira-Saade, 1996; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007) y es la más estudiada dentro del género *Sechium* P. Browne, de la cual se han realizado diversos estudios con frutos, hojas, semillas. Existen reportes sobre su actividad diurética (Jensen *et al.*, 1986), anti-inflamatoria (Salama *et al.*, 1986) e hipotensora (Cambar *et al.*, 1980; Guppy *et al.*, 2000), antimutagénica (Yen *et al.*, 2001) y antibacteriana (Ordoñez *et al.*, 2003). Se ha establecido que coadyuva a la eliminación de cálculos renales y es utilizado como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour *et al.*, 2002), además de atenuar la inflamación intestinal y cutánea, y favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los frutos de *Sechium edule* contiene peroxidases, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides, taninos y terpenos como cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005; Aguiñiga, 2013), 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; Ordoñez *et al.*, 2006; Aguiñiga, 2013). Wu *et al.* (1998), caracterizó a la proteína “sechiumina” del extracto acuoso de la semilla, la cual tiene propiedades de inactivación ribosomal y podría ser un posible agente quimioterapéutico.

Estudios recientes por Cadena *et al.* (2013), en extractos de ocho variedades de *S. edule* (Jacq.) Sw., sobre la proliferación de las líneas celulares HeLa, L929 y P388, los resultados indicaron que los grupos varietales Vici<sup>®</sup> y Bernyano<sup>®</sup> tienen potencial antiproliferativo. Sosa (2008); evaluó los extractos acuoso, metanólico y etanólico de *S. edule* (Jacq.) Sw. var. *nigrum spinosum* en las líneas HeLa y L929, donde concluye que el metanólico y el etanólico son los que tienen actividad antiproliferativa y citotóxica de forma dosis-dependiente en éstas líneas celulares. Monroy-Vázquez *et al.*, (2009), obtuvieron cuatro fracciones a partir del extracto alcohólico de *S. edule*, de las cuales tres presentaron actividad antiproliferativa en células HeLa, indicando que los componentes químicos de dicha fracción, corresponden al grupo de ésteres de ácidos grasos saturados; ampliando el conocimiento de metabolitos reportados para la especie y que presentan actividad antineoplásica.

### ***Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang**

Es una planta endémica de una pequeña región de México, considerada especie amenazada ya que no representa valor alguno para los pobladores. Se encuentra en áreas con alta humedad y altitudes desde 20 a 800 m, los frutos son lisos, aunque se reporta una variedad con espinas (Lira-Saade, 1996). La variación en color de los frutos registrada en las colectas va del verde oscuro a café-rojizo, de forma oval aplanada, tamaño pequeño, sin presencia de espinas y surcos suaves (Figura 3) (Archivo GISeM). Sirve como alimento para armadillos, ardillas y algunos otros herbívoros, pero no se conocen aplicaciones en el consumo humano (Aguíñiga, 2013).



Figura 3. Variación de color de frutos de *Sechium chinantlense* (Tomado del Archivo del Grupo Interdisciplinario de *Sechium edule* en México, A.C. [GISeM, 2008]).

## **Antecedentes**

Estudios del grupo de investigación GISeM, demuestran efecto antiproliferativo *in vitro* de los extractos de otras especies de *Sechium* P. Browne, tales como, *S. chinantlense* y *S. compositum*; donde se establece que existe su efecto en líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino humano HeLa, fibrosarcoma de pulmón de ratón L-929 (Rivera-Martínez, 2011), leucemias macrofágicas de ratón P-388 y J774 (Tiburcio, 2011; Cadena-Zamudio, 2013), leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 y médula ósea normal de ratón (Aguñiga, 2013). Se observan diferencias importantes entre las células tumorales y normales, ya que induce muerte por apoptosis a las células tumorales y leucémicas, sin producir el mismo efecto en las células normales de médula ósea, sugiriendo que los extractos de *Sechium* P. Browne, pueden actuar de manera selectiva y por tanto con potencial antitumoral.

Por lo anterior es importante identificar los mecanismos por los cuales los extractos están induciendo la apoptosis; y para tal efecto, se evaluó la inducción de apoptosis del extracto de *Sechium chinantlense* sobre la línea de cáncer de cérvix HeLa.

## **Planteamiento del problema**

Los extractos metanólicos de diversos genotipos del género *Sechium* P. Browne, tales como, *S. chinantlense* Lira & F. Chiang., *S. compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., y un híbrido H-387-07, inhiben la proliferación e inducen formación de cuerpos apoptóticos sobre la línea celular HeLa (Rivera-Martínez, 2011), sin embargo, se desconoce el mecanismo de inhibición de la proliferación, que puede ser consecuencia de un efecto citostático o citotóxico, incluyendo la inducción de apoptosis. Con base en lo anterior, se analizó el efecto del extracto crudo de *S. chinantlense* y se compara con Cisplatino, que es un antineoplásico de uso clínico contra cáncer de cérvix (Lo Presti *et al.*, 2008), sobre la progresión del ciclo celular en la línea HeLa, así como la posible inducción de apoptosis, ya sea por vía intrínseca o extrínseca. Lo anterior permitiría dilucidar si el extracto crudo activa rutas de muerte celular similar a los inducidos por un antineoplásico ampliamente usado, además de determinar el potencial antitumoral de una planta endémica de México.

## **Hipótesis**

Si el extracto metanólico de *Sechium chinantlense* inhibe la proliferación celular mediante la formación de cuerpos apoptóticos en células HeLa, e induce la fragmentación de ADN en líneas leucémicas, se espera que el extracto metanólico de *S. chinantlense* induzca la apoptosis y fragmentación del ADN mediante la activación de una de las vías apoptóticas, en la línea celular de cáncer de cérvix HeLa.



## **Objetivo general**

Identificar el mecanismo de inhibición de la proliferación inducido por el extracto de *Sechium chinantlense* sobre la línea celular HeLa.

## **Objetivos particulares**

- i. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la fragmentación de ADN de células HeLa.
- ii. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la distribución del ciclo celular en la línea celular HeLa.
- iii. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la activación de p53 de células HeLa.
- iv. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la translocación de fosfatidilserina de las células HeLa.
- v. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la liberación de citocromo-c de las células HeLa.
- vi. Evaluar el efecto de *S. chinantlense* sobre la activación de caspasa-8 y caspasa-3 de células HeLa.

## Método

### Obtención del extracto

Se utilizaron frutos de *Sechium chinantlense* donados por GISEM (GISEM, 2008), colectados en madurez hortícola a los  $18 \pm 2$  días después de antesis (Cadena *et al.*, 2007), se picaron en hojuelas incluyendo exocarpo y semilla, fueron secados a  $40^{\circ}\text{C}$  en un horno con circulación de aire (BLUE-M, electronic company/blue Island, USA) hasta deshidratación completa, para su molido posterior. Se realizó una extracción química discontinua con 1.5 kg del material molido macerado en metanol a temperatura ambiente y cada 48 horas se hizo cambio de solvente, concentrando en un rota evaporador (IKA<sup>®</sup> RV10, automático/BUCHI R-114 Equipan, Switzerland) a  $50^{\circ}\text{C}$  recuperando el extracto. Lo anterior se repitió 25 veces hasta que el solvente no mostró color (Che *et al.*, 1985; Afifi *et al.*, 1999; Cadena-Iñiguez, 2005). El extracto obtenido se mantuvo en un frasco ámbar a temperatura ambiente del cual se pesó 71.2 mg y fue solubilizado en 40  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y 960  $\mu\text{L}$  de PBS (Solución buffer de fosfatos). Se centrifugó a 2000 rpm por 5 min y el sobrenadante se filtró y diluyó en PBS para obtener las concentraciones de 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto *Sechium chinantlense*.

## **Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular HeLa que es un adenocarcinoma de tejido epitelial de cérvix humano, es de tipo epitelial con característica adherente; y como control de células epiteliales no tumorigénicas, se utilizó la línea celular inmortalizada y no tumoral HaCaT que son queratinocitos provenientes de tejido epitelial de piel humano, con característica adherente. Las células HeLa se mantuvo a una densidad de  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  y HaCaT  $7 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Médium) (GIBCO-BRL.,) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) desactivado por calor, y mantenidas en cajas petri de vidrio de 5 mL a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad dentro de una incubadora (Thermo Forma, USA), realizando cambio de medio cada 48 horas (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan *et al.*, 1993).

## **Ensayos de proliferación celular**

Se evaluó el efecto del extracto *S. chinantlense* y del antineoplásico comercial Cisplatino "Blastolem RU<sup>®</sup>" (TEVA, México) sobre la proliferación celular de las líneas celulares HeLa y HaCaT, con el fin de determinar las  $\text{IC}_{50}$  para los ensayos posteriores. Se emplearon  $2 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  de células HeLa y HaCaT que fueron cultivadas por 72 horas en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, USA) con 0.0, 0.15, 0.30, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de *S. chinantlense*; y con 0.0, 0.14, 0.28, 0.56, 1.12, 2.25, 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cisplatino. La proliferación celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta (Gillies *et al.*, 1986), mediante la cual se tiñe el ADN del núcleo de las células

considerado como un parámetro indirecto para cuantificar número celular. Se fijaron las células por una hora con 50  $\mu\text{L}$  pozo<sup>-1</sup> de glutaraldehído al 1.1%, se retiró y se tiñeron con 50  $\mu\text{L}$  pozo<sup>-1</sup> de cristal violeta; se enjuago con agua destilada y adicionaron 50  $\mu\text{L}$  pozo<sup>-1</sup> de ácido acético 10%, para posteriormente, agitar por 20 minutos. La densidad óptica se evaluó a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria). Los resultados se graficaron como porcentaje de proliferación con respecto al control.

### **Evaluación de la viabilidad y número celular**

Las células se cultivaron bajo las condiciones mencionadas en placas de 24 pozos fondo plano ultra baja adherencia para HeLa y adherencia normal para HaCaT (Costar, Cambridge, MA, USA) con la concentración de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y de cisplatino, correspondientes a cada línea celular y fueron evaluadas después de 24, 48, 72 y 96 horas. Transcurrido cada tiempo se recuperaron las células y se realizó conteo directo con hemocitómetro y por exclusión de azul tripano; el cual entra a las células que presentan daño en la membrana tiñendo el núcleo de azul, las cuales ya no son consideradas células viables, es decir muertas. Se calculó el número celular y el porcentaje de viabilidad de cada conteo.

### **Evaluación del porcentaje de cuerpos apoptóticos**

La aparición de cuerpos apoptóticos es indicador de la detección en forma sencilla y barata la inducción de muerte por apoptosis (Elmore, 2007; Fenech, 2007), para lo cual se obtuvieron  $1 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> de las líneas HeLa y HaCaT, después de ser

cultivadas por 24, 48, 72 y 96 horas con la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino para cada línea celular, correspondientes al ensayo de viabilidad celular. Transcurrido cada tiempo se recolectaron las células para realizar un citospyn, posteriormente se fijó con 1 mL<sup>-1</sup> de metanol y se tiñó con colorante Giemsa al 10%. Se observó al microscopio (Carl Zeiss, Primo Star, Germany), con un lente de objetivo 40x, cambios morfológicos tales como, disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, pérdida de la regularidad de la membrana celular y nuclear como parámetros citomorfológicos evaluados como inducción de formación de cuerpos apoptóticos. Se contaron 200 células de cada condición para obtener el porcentaje de células apoptóticas con respecto a las normales.

### **Concentración de inhibición media (IC50)**

Para determinar la concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en 50% (IC<sub>50</sub>) de las líneas celulares, se empleó la ecuación de regresión lineal, de la curva dosis-respuesta de proliferación correspondiente a cada línea celular tratada con el extracto de *S. chinantlense* y cisplatino.

### **Evaluación de la translocación de fosfatidilserina con Anexina V-PE**

Una de las primeras señales que indican que una célula entra en apoptosis, es la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS) de la cara interna de la membrana plasmática hacia la superficie extracelular, donde puede ser detectada por unión con un anticuerpo específico que está conjugado al fluorocromo Anexina V-PE. Luego de 72

horas de cultivo en presencia de la  $IC_{50}$  del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, ambas líneas celulares fueron obtenidas y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células se resuspendieron en 200  $\mu$ L del buffer de fijación 1x, se añadió 5  $\mu$ L de Anexina V-PE y 5  $\mu$ L de 7AAD, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Se adicionaron 300  $\mu$ L del buffer de fijación 1x. La cuantificación de unión de Anexina V-PE a fosfatidilserina se leyó a 488 nm y el de 7AAD a 532 nm, en un citómetro de flujo BD FACSAriaII (Se empleó un metabolito secundario [7AAD] el cual entra a la célula cuando la membrana se encuentra dañada (necrosis), permitiendo distinguir a las células necróticas [cuadrante Q1] de las apoptóticas [cuadrante Q4], la población del cuadrante Q2 indica apoptosis tardía y el cuadrante Q3 son las células vivas que no están en ningún tipo o proceso de muerte (Figura 15 y 16).

### **Evaluación del ciclo celular por incorporación de yoduro de propidio**

Para el ensayo de ciclo celular, las células HeLa y HaCaT fueron estimuladas por 48 horas con las concentraciones de  $IC_{50}$  del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, transcurrido el tiempo, se obtuvieron  $5 \times 10^5$  células y se lavaron dos veces con PBS. Se resuspendieron cuidadosamente durante todo el manejo de la técnica; se adicionó 1 mL de etanol al 70%, frío, y se dejaron reposar toda la noche a 4°C para fijar las células. Al día siguiente, se lavaron una vez con 1 mL de PBS y fueron resuspendidas con 100  $\mu$ L de PBS con el que se pasaron a tubos, al cual se le adicionó 3  $\mu$ L de ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, USA) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo y en la oscuridad se adicionó a cada muestra 3  $\mu$ L de yoduro de propidio y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min protegido de la luz.

Posteriormente se realizó la lectura en el citómetro de flujo BD FACSAria II, la cuantificación de la incorporación del yoduro de propidio en las células HeLa y HaCaT se leyó en un rango de 488-561 nm y se analizaron las gráficas lineales seleccionando la población más compacta y homogénea de la gráfica PI-W vs PI-A. Finalmente, los datos fueron analizados por el software de análisis para ciclo celular Flowing Software 2 para obtener los histogramas y porcentajes finales.

### **Evaluación de p53 y caspasa-3 activos por citometría de flujo**

Para esta evaluación se utilizó el PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™) y el anticuerpo Alexa Fluor® 647 Mouse anti-p53 (acK382) (BD™ Phosflow), que reconoce el residuo de lisina 382 acetilado en la región C-terminal de p53. Se realizó el procedimiento del kit y al momento de marcar las células se emplearon los dos anticuerpos por separado. Las células HeLa y HaCaT fueron estimuladas por 48 horas con las concentraciones de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, transcurrido el tiempo se obtuvo 5x10<sup>5</sup> células, se colocaron en tubos ependorff y se lavaron con PBS, para ser resuspendidas en BD Cytotfix/Cytoperm™ y se incubaron en hielo por 20 min. Se lavaron dos veces con BD Perm/Wash™ diluido a 1X, se separó cada muestra en dos tubos ependorffs y uno fue marcado con 5 µL del anticuerpo para caspasa-3 y el otro con 5 µL del anticuerpo para p53, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min protegidos de la luz. Se realizó un lavado final y se leyeron en el citómetro de flujo BD FACSAria II en diferentes canales, caspasa-3 en el de PE y p53 en el de Alexa Fluor® 647.

## **Evaluación de citocromo-c citoplasmático en lisado celular por ELISA**

Para la determinación cuantitativa de concentraciones de citocromo c humano en lisado celular, se utilizó el Human Cytochrome c Immunoassay (Quantikine<sup>®</sup> ELISA). Se realizó el procedimiento del kit. Brevemente, las células HeLa y HaCaT fueron estimuladas por 48 horas con las concentraciones de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, transcurrido el tiempo se obtuvieron 1x10<sup>6</sup> células que se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en el buffer de lisis celular mantenidas en agitación suave por una hora a temperatura ambiente (±24°C). Se centrifugaron y se tomaron 50 µL del sobrenadante a otro tubo ependorff con 200 µL de calibrador diluyente RD5P (diluido 1:10), y en los pozos empleados para la evaluación se agregaron 100 µL del mismo calibrador y 100 µL de cada muestra previamente diluida, se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Posteriormente, se lavaron cuatro veces con el buffer de lavado. Se adicionó a cada pozo 200 µL del conjugado de Citocromo c Humano y se incubaron de nuevo por dos horas. Se lavaron cuatro veces más y se adicionaron 200 µL de la solución substrato (previamente preparada) se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente se adicionaron 50 µL de la solución de paro y cambió de color azul a amarillo e inmediatamente se leyó la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria). Los resultados se calcularon con respecto a la curva estándar que se realizó con el mismo kit.



### **Evaluación de caspasa 8 activa por ensayo colorimétrico**

Se utilizó el kit Caspase-8 Colorimetric Assay (R&D Systems®) estimulando las células de HeLa y HaCaT por 24 horas con las concentraciones de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino; transcurrido el tiempo, se obtuvieron 2x10<sup>6</sup> células, se colocaron en tubos ependorffs, resuspendiendo únicamente el botón celular con el buffer de lisis frío y se incubaron en hielo por 10 min. Se centrifugó y transfirió sólo el sobrenadante a un nuevo ependorff y se mantuvieron en hielo; posteriormente se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar, USA) 50 µL del lisado celular, 50 µL del 2X Reaction buffer 8 (previamente preparado) y 5 µL del sustrato colorimétrico de caspasa-8. Se incubó a 37°C por dos horas y finalmente se evaluó a 490 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria), graficando los resultados.

### **Evaluación de la fragmentación del ADN por electroforesis en gel de agarosa**

Después de 72 horas de estímulo con las concentraciones de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, se obtuvieron 1x10<sup>6</sup> células de HeLa y HaCaT, las cuales se colocaron en tubos ependorff con 2 mL de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min a 17°C, se retiró todo el sobrenadante y fueron tratadas con 500 µL de DNAzol, se resuspendió por inversión gentilmente hasta deshacer el botón y se refrigeraron por 20 min. Posteriormente se adiciono 1 mL de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión 6 veces, se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante

cuidando de dejar el botón con la fase viscosa que lo cubre, se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70% se mezcló por inversión y se centrifugó cada vez a 12000 rpm por 12 min a 4°C. Después se evaporó el etanol por 3 min, finalmente se hidrató con 100 µL de agua DEPC estéril. Posteriormente, la electroforesis se corrió en un gel de agarosa 1.5% que contiene bromuro de etidio (0.5 mg/mL) en buffer TBE a 90 volts por 110 min. Se utilizó como control el marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1kb Plus ADN (Genetimes Technology, Hong Kong). Las bandas de ADN se observaron en un fotodocumentador con luz UV (DigiDoc-it UVP, USA) del cual se obtuvo una fotografía con el programa Acquisition Software (UVP, USA).

### **Manejo de datos**

Todos los experimentos se realizan por triplicado con tres repeticiones por condición. Los datos se presentaron como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de cada grupo. Para la diferencia estadísticamente significativa entre los datos se realiza un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey y Dunnet con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 18.0 para Windows.

## Resultados

### Efecto de *S. chinantlense* sobre la proliferación celular de la línea HeLa y HaCaT

El cisplatino es un antineoplásico de uso clínico contra cáncer de cérvix (Lo Presti *et al.*, 2008) y muchos otros tipos de cáncer, pero fue necesario confirmar que el cisplatino inhibe la proliferación celular. En relación a las concentraciones reportadas para el cisplatino en la línea HeLa (Hernández-Flores *et al.*, 2011), se utilizó un rango de 0.14 a 4.5  $\mu\text{g/mL}$  para observar la curva de inhibición de la proliferación, en ambas líneas celulares. Los resultados muestran que después de 72 horas de estímulo, la proliferación se inhibió de manera significativa a partir de la concentración de 0.14  $\mu\text{g/mL}$  para la línea celular HeLa, y 0.56  $\mu\text{g/mL}$  para la línea celular HaCaT (Figura 4).

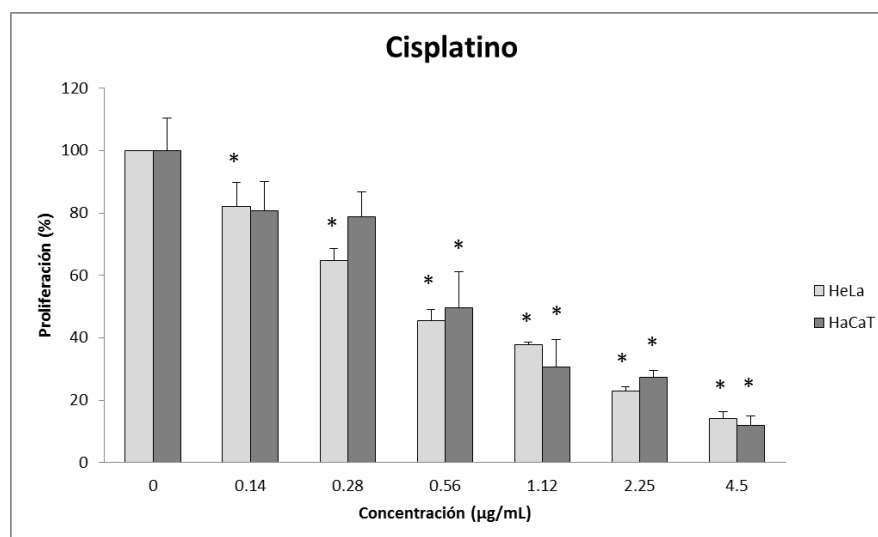


Figura 4. Efecto de cisplatino sobre la proliferación de células HeLa y HaCaT. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar. La diferencia es significativa respecto al control (0) \* $P < 0.05$  en el ANOVA-Tukey-Dunnett.

En base a las concentraciones reportadas por Aguiñiga, (2013) para el extracto *S. chinantlense*, se confirmó la disminución de la proliferación dependiente de la concentración del extracto de *S. chinantlense* en las líneas celulares, las cuales después de 72 horas de estímulo se inhibió la proliferación de manera significativa a partir de la concentración 1.2 µg/mL para la línea celular HeLa y a partir de 0.6 µg/mL para HaCaT (Figura 5).

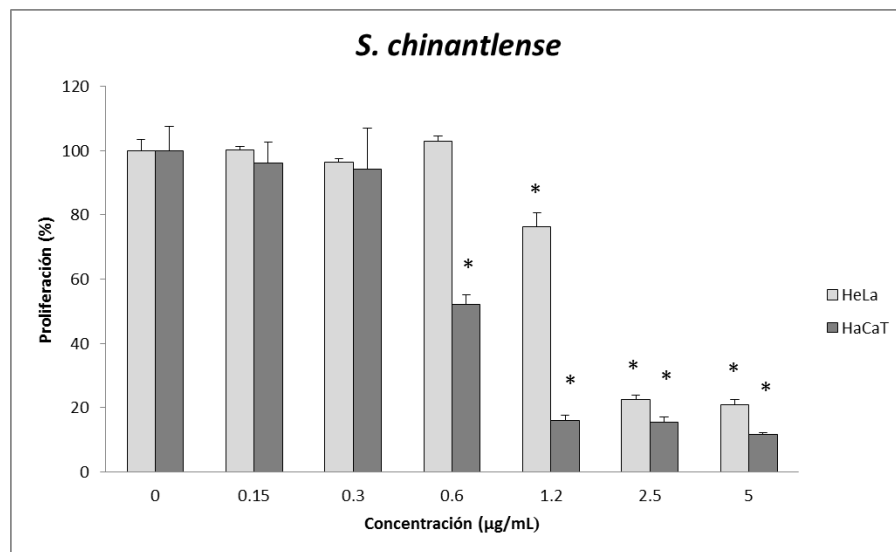


Figura 5. Efecto del extracto de *S. chinantlense* sobre la proliferación de células HeLa y HaCaT. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar. La diferencia es significativa respecto al control (0) \*P<0.05 en el ANOVA-Tukey-Dunnett.

Empleando los datos de las curvas dosis respuesta, mediante la ecuación de regresión lineal se calculó la concentración de inhibición media de la proliferación ( $IC_{50}$ ), que es la cantidad necesaria para inhibir al 50 % la proliferación de las células. En el caso de cisplatino correspondieron a 0.72 y 0.56  $\mu\text{g/mL}$  para las células HeLa y HaCaT respectivamente; y en el caso del extracto *S. chinantlense* fue 1.82 y 0.73  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 1).

Concentración de inhibición media ( $IC_{50}$ )		
Línea celular	<i>S. chinantlense</i> ( $IC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )	Cisplatino ( $IC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )
HeLa	1.82	0.72
HaCaT	0.73	0.56

Tabla 1. Concentración de inhibición media de la proliferación ( $IC_{50}$ ) del extracto de *S. chinantlense* y cisplatino sobre la proliferación de las líneas celulares HeLa y HaCaT

Una vez confirmada la actividad antiproliferativa de cisplatino y del extracto vegetal, y con la finalidad de evaluar la viabilidad celular de la  $IC_{50}$  de cisplatino y el extracto en cada línea celular, se empleó la  $IC_{50}$  para evaluar el incremento del número celular de ambas líneas a 24, 48, 72 y 96 horas, registrando un incremento constante del número celular en el control, sin embargo, en el extracto *S. chinantlense* y cisplatino, como se esperaba, se observó claramente la disminución del número celular en ambas líneas (Figura 6 y 7).

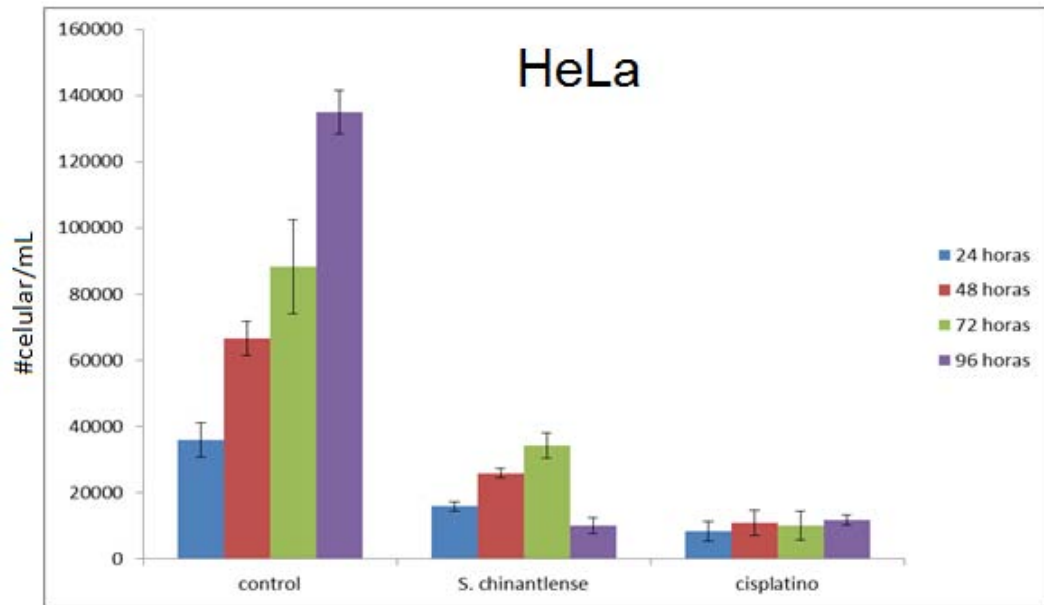


Figura 6. Número celular de la línea HeLa a diferentes tiempos con la  $IC_{50}$  del extracto *S. chinantlense* y cisplatino. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar.

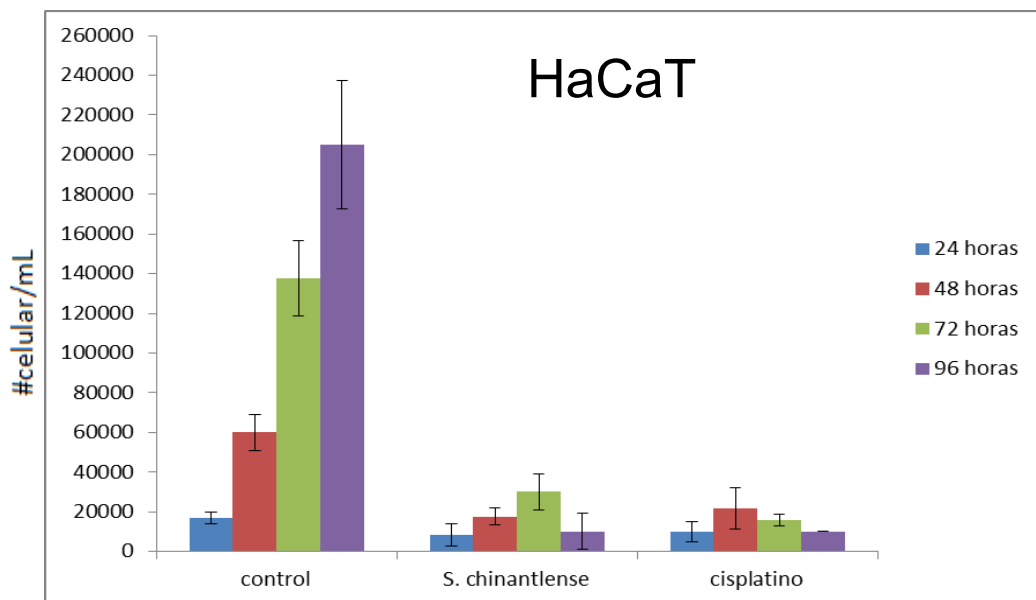


Figura 7. Número celular de la línea HaCaT a diferentes tiempos con la  $IC_{50}$  del extracto *S. chinantlense* y cisplatino. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar.

### Efecto de *S. chinantlense* sobre la viabilidad celular de la línea HeLa y HaCaT

Mientras que la viabilidad a 24, 48, 72 y 96 horas en presencia del extracto de *S. chinantlense*, el cual disminuyó la viabilidad celular de ambas líneas, sin embargo, en las células HaCaT sólo redujo 40%, mientras que a las células HeLa hasta 60%. El cisplatino disminuyó en menor grado la viabilidad celular registrando para HeLa 40%, aunque después de 96 horas la viabilidad se incrementó. Referente a las células HaCaT, la reducción fue de 25%, sin embargo al llegar a las 96 horas, la viabilidad disminuyó a 75% (Tabla 2).

#### Viabilidad celular (%)

	Control		<i>S. chinantlense</i>		Cisplatino	
	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT
<b>24 h</b>	94±9.6	96±7.2	84±1.3	61±19.2 *	92±14.4	75±25
<b>48 h</b>	95±1.7	88±6.0	68±6.7 *	81±3.2	64±26.7 *	78±20.9
<b>72 h</b>	93±3.6	96±2.3	51±12.2 *	89±3.0 *	93±11.5	70±11.5 *
<b>96 h</b>	98±3.3	93±5.6	43±32.9 *	65±2.9 *	85±13.2	25±0 *

Tabla 2. Viabilidad celular de las líneas HeLa y HaCaT con la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino, a diferentes tiempos. Los datos son promedios ± desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al control \*P<0.05 en el ANOVA-Tukey-Dunnett.

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea HeLa y HaCaT

Bajo las mismas condiciones experimentales, se evaluó la citomorfología a fin de observar la inducción de cuerpos apoptóticos. Desde las 24 horas de cultivo, ambos estímulos indujeron la formación de cuerpos apoptóticos en las células HaCaT; mientras en las células HeLa la formación de cuerpos apoptóticos fue mayor por efecto del extracto *S. chinantlense* comparado con el cisplatino (Tabla 3).

### Cuerpos apoptóticos (%)

	Control		<i>S. chinantlense</i>		Cisplatino	
	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT
<b>24 h</b>	0.2±0.3	0.6±0.5	29±4.7 *	9.7±1.3 *	4.0±1.4 *	7.4±2.8 *
<b>48 h</b>	0.8±0.8	4.8±4.4	28±4.5 *	17.2±6.9 *	4.1±1.5 *	12.4±5.3
<b>72 h</b>	1.9±1.7	1.5±0.5	17±2 *	9.2±0.8 *	5.7±0.1 *	14.2±2.1 *
<b>96 h</b>	1.6±0	1.1±0.4	23±2.8 *	15±0 *	6.3±1.5 *	26.7±21 *

Tabla 3. Formación de cuerpos apoptóticos inducidos por la IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* y cisplatino en las líneas celulares HeLa y HaCaT, a diferentes tiempos. Los datos presentados son promedios ± desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al control (0) \*P<0.05 en el ANOVA-Tukey-Dunnett.



## Efecto de *S. chinantlense* sobre la fragmentación de ADN de la línea celular HeLa

Al observar que las líneas celulares presentaron un número de cuerpos apoptóticos considerable, se confirmó su fragmentación de ADN, ya que es una de las principales características de la apoptosis tardía. Se producen fragmentos de entre 180 a 200 pares de bases, y se detecta por electroforesis. Se evaluó la fragmentación del ADN después de 72 horas con las concentraciones de IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino. El patrón de fragmentación del ADN en la línea celular HeLa se presentó por efecto de ambos estímulos, incluyendo a camptotecina como control de fragmentación, y se observa que el control presenta el ADN integro (Figura 8). En las células HaCaT no hay evidencia concluyente sobre la fragmentación de ADN.

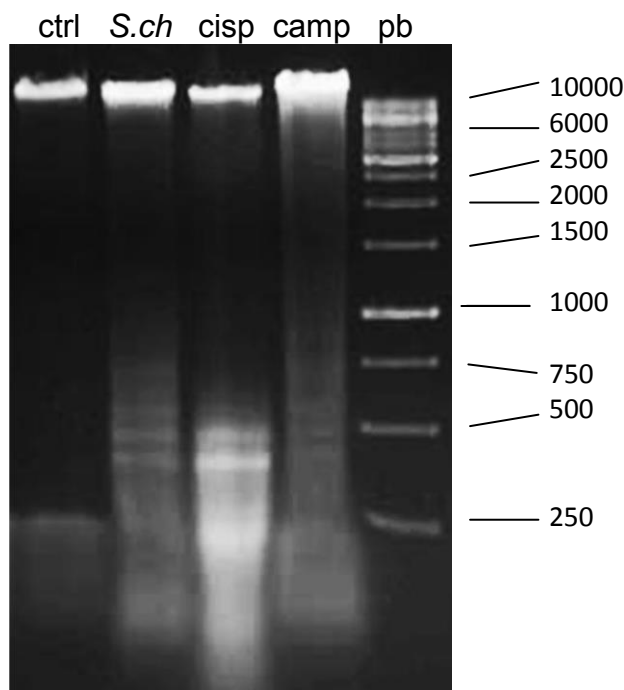


Figura 8. ADN fragmentado proveniente de células HeLa, después de 72 horas: ctrl=control, *S.ch*=IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense*, cisp= IC<sub>50</sub> de cisplatino, camp=camptotecina, pb=pares de bases.

## Efecto de *S. chinantlense* en el ciclo celular de la línea HeLa y HaCaT

Para la evaluación del ciclo celular de las IC<sub>50</sub> del extracto de *S. chinantlense* y la de cisplatino sobre ambas líneas, primero evaluó la necesidad de sincronizar o no a las células. Los resultados indican que las células sincrónicas o asincrónicas, tiene el mismo comportamiento al evaluar el ciclo celular (Figura 9).

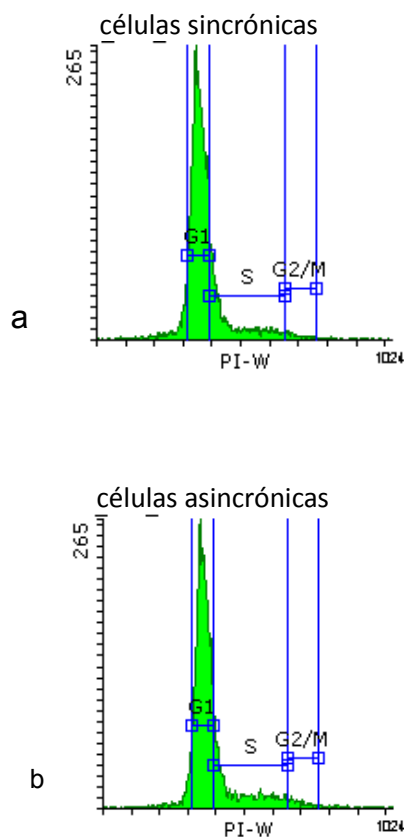


Figura 9. Evaluación de la sincronía en células HeLa cultivadas: a) células cultivadas sin SFB por 24 horas tiempo en el cual se realizó cambio el medio con 10% de SFB. b) células sembradas el día de cambio de medio de las células sincrónicas, con medio suplementado al 10% de SFB.

Al confirmar que no era necesario sincronizar las células, posteriormente se analizó si bajo las condiciones de estudio se tenía la sensibilidad para detectar alteraciones en la progresión del ciclo. Por lo anterior, al cultivo de HeLa se adicionó colchicina para inhibir la división celular por 2 horas antes de la lectura en el citómetro. Los datos indicaron que la colchicina afecta la progresión del ciclo celular porque disminuye la población en la fase G1 y aumenta la de la fase S (Figura 10), lo que sugiere que la técnica es sensible para detectar cambios en las fases del ciclo celular.

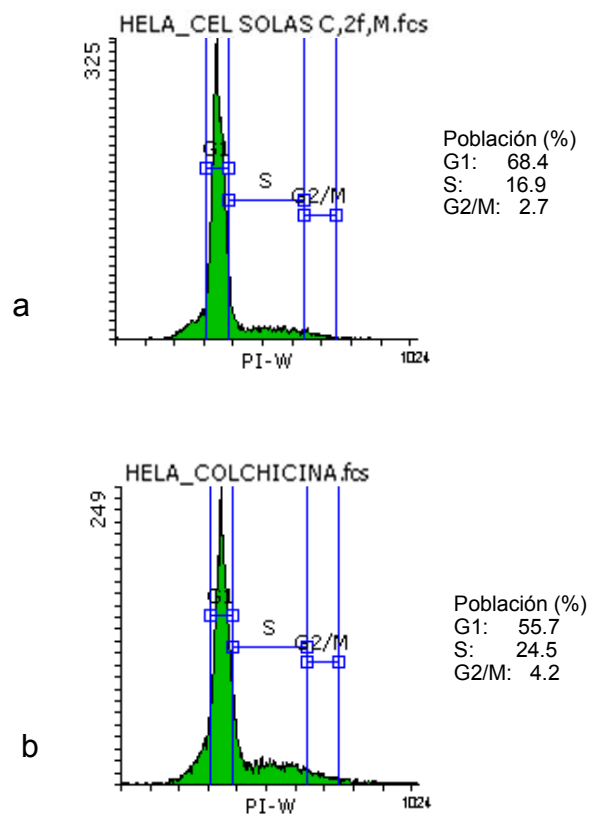


Figura 10. Evaluación del ciclo celular en la línea HeLa, por la incorporación de yoduro de propidio: a) células solas y b) células cultivadas por dos horas con colchicina.

Al corroborar la sensibilidad de la técnica, se procedió a realizar el ensayo utilizando las concentraciones de (IC<sub>50</sub>) 1.82 µg/mL de *S. chinantlense* y 0.72 µg/mL de cisplatino para la línea celular HeLa. Después de 72 horas, el extracto redujo el porcentaje de células en las fases del ciclo celular G1, S y G2/M y a su vez aumentan considerablemente la población en SubG0, comparados con el control. El cisplatino reduce evidentemente la población en G1, aumenta la fase SubG1 y S (Figura 11).

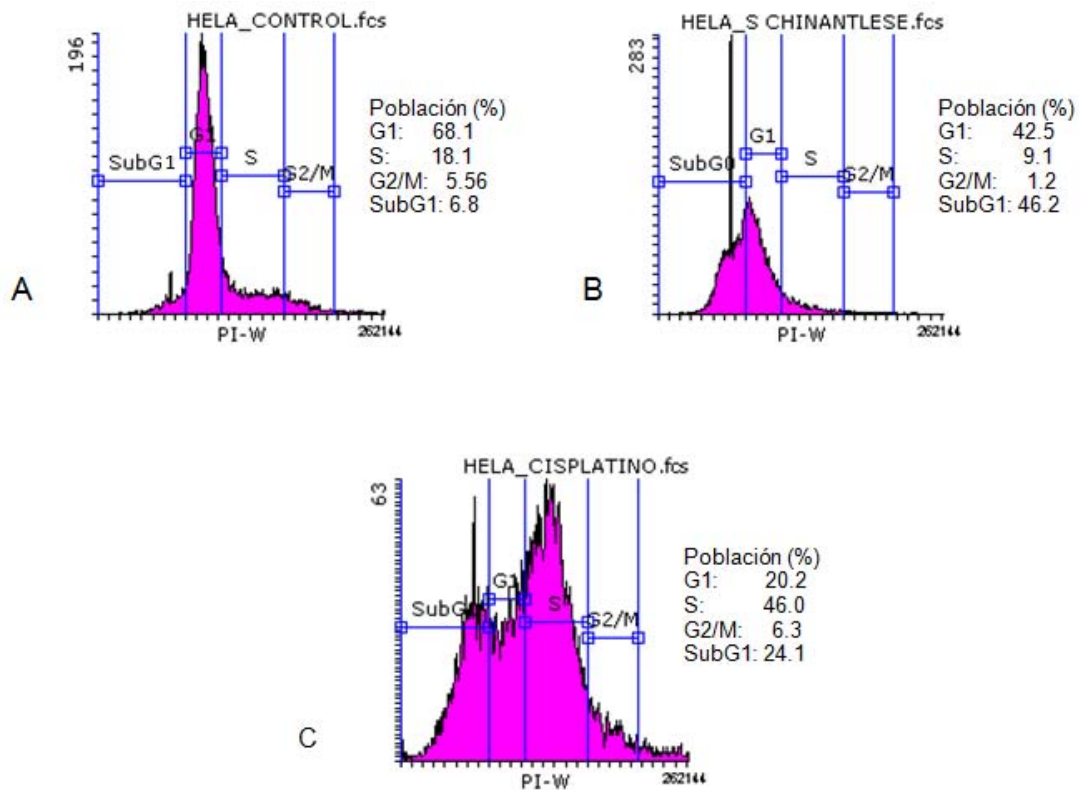


Figura 11. Efecto de las IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* (B) y cisplatino (C) sobre el ciclo celular de la línea HeLa, a las 72 horas: control (A).

Para la línea celular HaCaT, la IC<sub>50</sub> del extracto de *S. chinantlense*, reduce el porcentaje de población en G1 y aumenta al doble la fase S y SubG1 con respecto al control. Con la IC<sub>50</sub> de cisplatino reduce evidentemente a la población en la fase G1, aumenta al doble la fase S y la fase SubG1 (Figura 12).

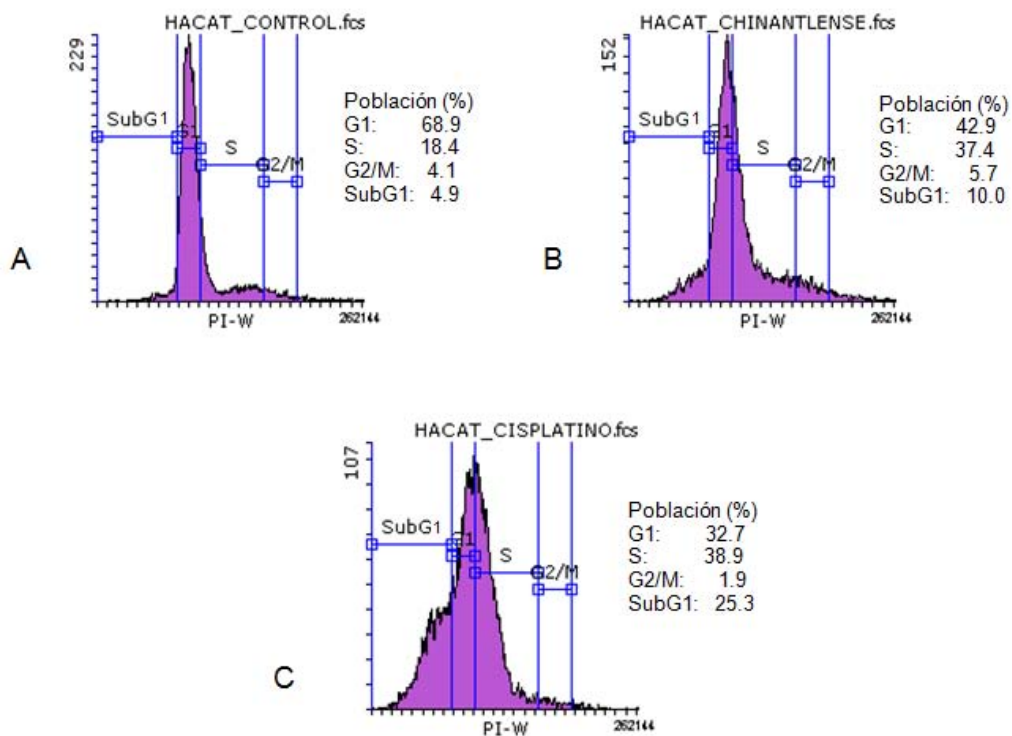


Figura 12. Efecto de las IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* (B) y cisplatino (C) sobre el ciclo celular de la línea HaCaT, a las 72 horas: control (A).

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la activación de p53 en células HeLa y HaCaT

La proteína p53 es una molécula que se activa cuando la célula sufre algún tipo de daño y puede indicar a la célula que inicie la apoptosis; por lo cual se evaluó si se encontraba a p53 activa. En células HeLa se observó que *S. chinantlense* aumentó el porcentaje de población con p53 activo respecto al control, mientras que el cisplatino casi no difirió (Figura 13); mientras que en células HaCaT, el cisplatino aumentó la población con p53 activo y *S. chinantlense* no (Figura 14).

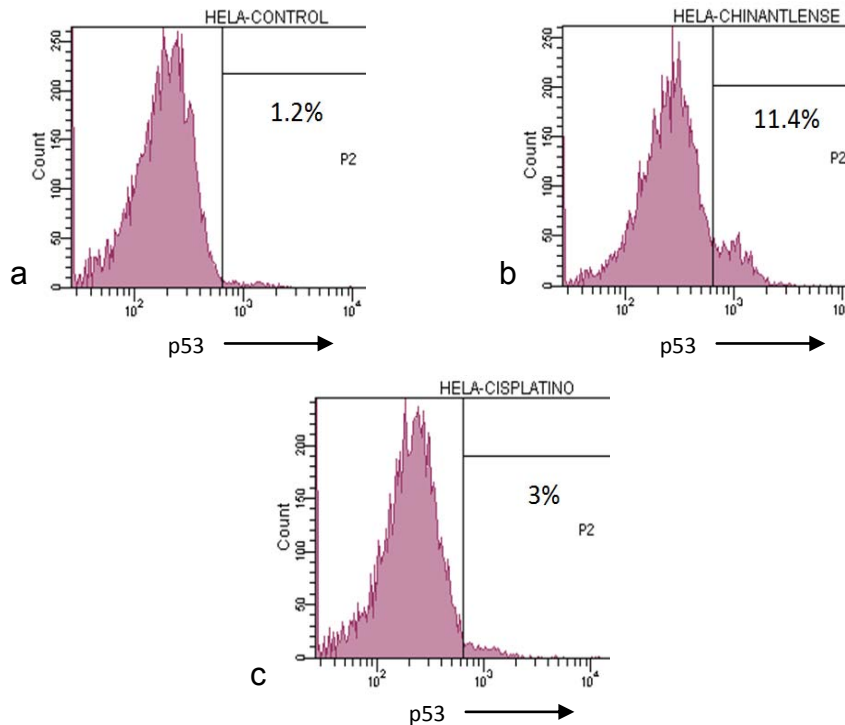


Figura 13. Evaluación de p53 activa en células HeLa con: a) control, células con la IC<sub>50</sub> de b) *S. chinantlense* y c) cisplatino, después de 48 horas de cultivo.

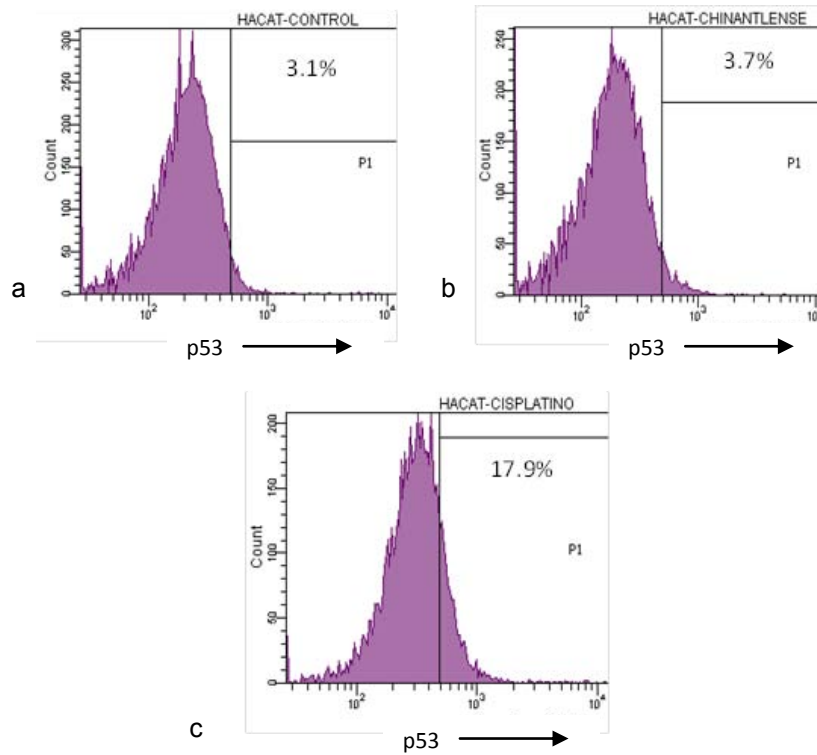


Figura 14. Evaluación de p53 activa en células HaCaT con: a) control, células con la  $IC_{50}$  de b) *S. chinantlense* y c) cisplatino, después de 48 horas de cultivo.

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la translocación de fosfatidilserina en las células HeLa y HaCaT

Una vez detectada la evidencia de estrés en ambas líneas celulares por activación de p53, se detectó la translocación de la fosfatidilserina unida específicamente a Anexina V-PE; registrando que la línea celular HeLa fue expuesta a las concentraciones de IC<sub>50</sub> 0.72 µg/mL de cisplatino y 1.82 µg/mL de extracto *S. chinantlense* por 72 horas, tiempo en el cual se incrementó el porcentaje de la población positiva para Anexina V-PE; en 22.9% por el extracto y 55.4% por el cisplatino, mientras que el control alcanzó sólo el 8.7% (Figura 15).

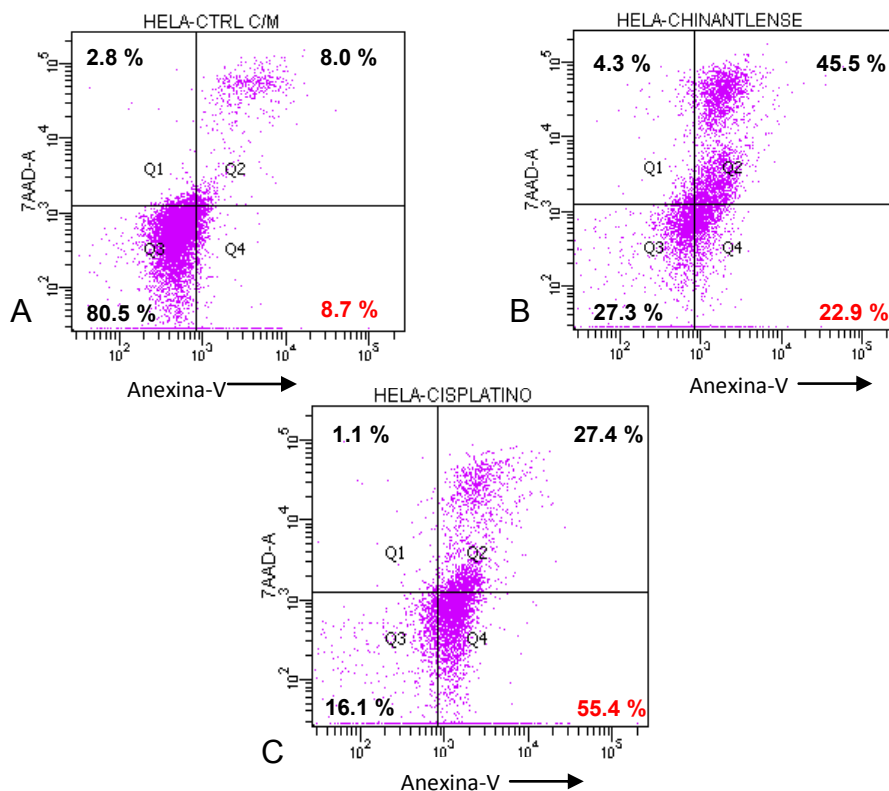


Figura 15. Efecto las IC<sub>50</sub> de B) *S. chinantlense* y C) cisplatino, sobre la translocación de fosfatidilserina (Anexina-V) en células HeLa, tratadas por 72 horas A) control.



En el caso de la línea celular HaCaT, se emplearon 0.56  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatino y 0.73  $\mu\text{g/mL}$  de extracto *S. chinantlense*, después de 72 horas se observó que el cisplatino aumentó el porcentaje de la población positiva para Anexina V-PE en 11.4%. Para el caso de las células tratadas con el extracto *S. chinantlense*, la población permaneció con un comportamiento similar al control (Figura 16).

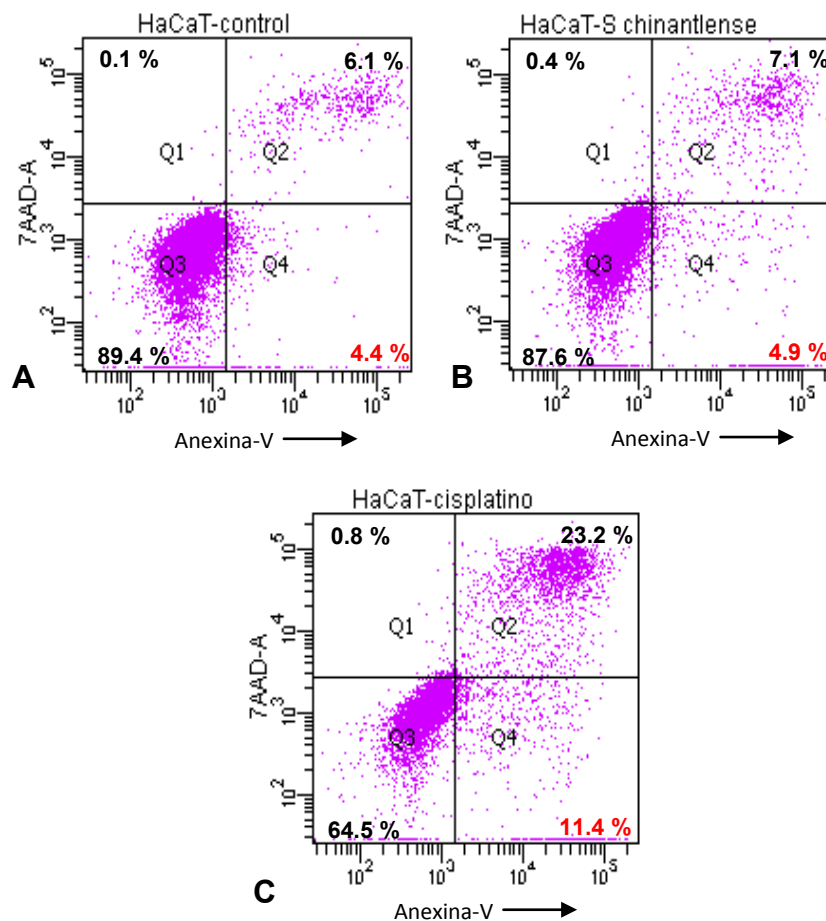


Figura 16. Efecto las  $IC_{50}$  de B) *S. chinantlense* y C) cisplatino, sobre la translocación de fosfatidilserina (Anexina-V) en células HaCaT, tratadas por 72 horas A) control.

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la activación de caspasa-8 en células HeLa y HaCaT

Cuando una señal de apoptosis externa llega a la membrana de la célula, ésta va a dar como respuesta interna la activación de caspasa-8 la cual inicia la señalización para apoptosis. Por lo cual se evaluó el aumento en la actividad relativa de caspasa-8 en las células HeLa y HaCaT. El cisplatino fue el único que incrementó la actividad de caspasa-8 en las células, aumentando con respecto al control 40% en las células HeLa, mientras que *S. chinantlense* no cambia de manera significativa con respecto al control, en ninguna de las líneas celulares (figura 17).

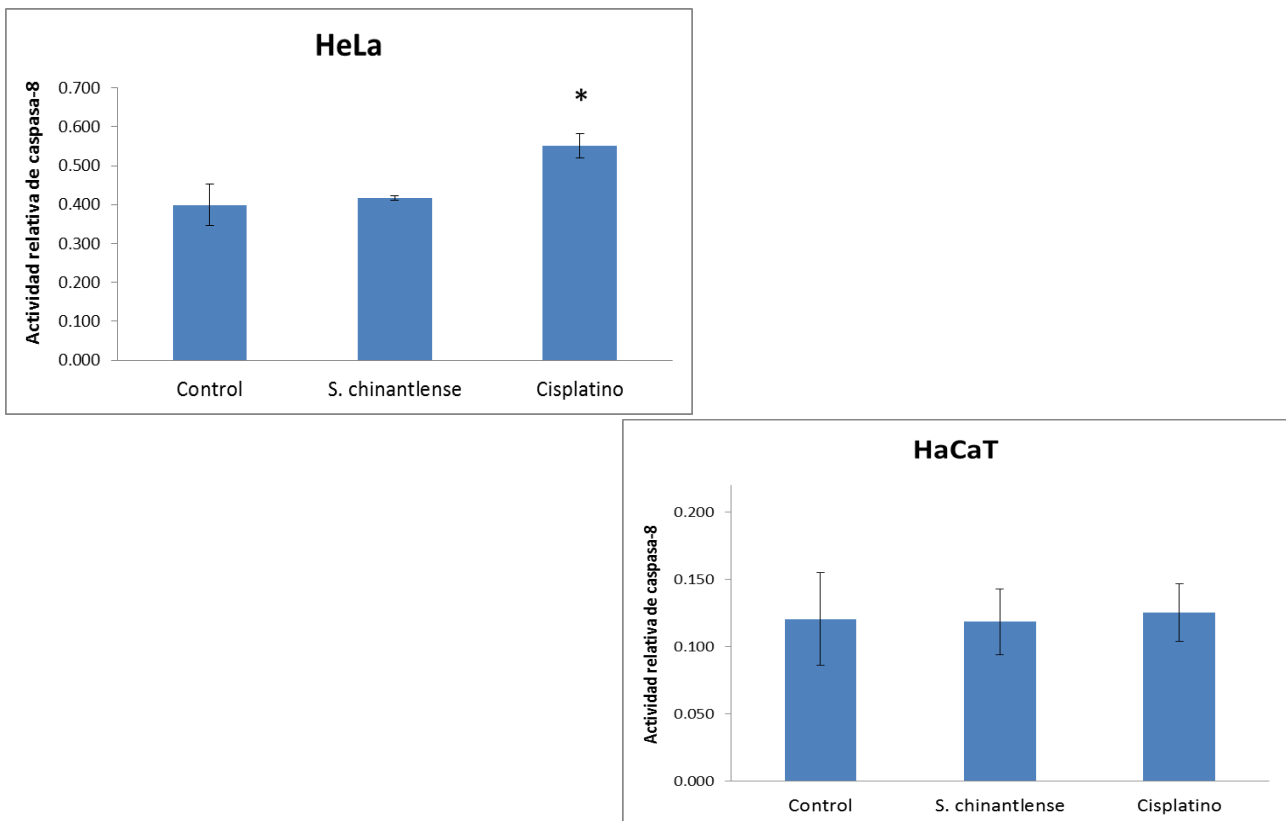


Figura 17. Actividad relativa de caspasa-8 en las líneas celulares HeLa y HaCaT tratadas con las IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino después de 24 horas. Valores promedios  $\pm$  desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al control \*P<0.05 en el ANOVA-Tukey-Dunnett.

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la liberación de citocromo-c en las células HeLa y HaCaT

Un proceso que ocurre durante la ruta intrínseca de la apoptosis, es la liberación de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma. Dicho evento va a desencadenar una cascada de señalización con el fin de continuar hacia la apoptosis. Para lo cual se evaluó la concentración citoplasmática de citocromo-c en las líneas celulares HeLa y HaCaT con las IC<sub>50</sub> de extracto *S. chinantlense* y cisplatino (Tabla 4). La concentración de citocromo-c en ambas líneas celulares aumenta casi al doble por efecto de *S. chinantlense* y cisplatino comparados con el control.

Concentración de citocromo-c (µg/mL)			
	Control	<i>S. chinantlense</i>	Cisplatino
HeLa	28.0 ±1.8	56.7 ±17.2*	54.7 ±6.2*
HaCaT	27.7 ±11.2	50.5 ±2.3*	47.7 ±7.2*

Tabla 4. Concentración citoplasmática de citocromo-c en células HeLa y HaCaT tratadas con las IC<sub>50</sub> de *S. chinantlense* y cisplatino después de 24 horas. Los datos presentados son promedios ± desviación estándar. La diferencia es significativa con respecto al control \*P<0.05 en el ANOVA-Tukey-Dunnett.

## Efecto de *S. chinantlense* sobre la activación de caspasa-3 en células HeLa y HaCaT

La activación de caspasa-3 determina la ejecución de la apoptosis celular, por lo que fue evaluada en las células con las  $IC_{50}$  de *S. chinantlense* y cisplatino. Registrando aumentos porcentuales de presencia de caspasa-3 activa en HeLa para *S. chinantlense* (21.7%), mientras que en cisplatino el aumento fue menor (Figura 18), y por el contrario, en HaCaT, el cisplatino aumentó considerablemente la población (21.5%) y el valor de *S. chinantlense* fue semejante al del control (Figura 19).

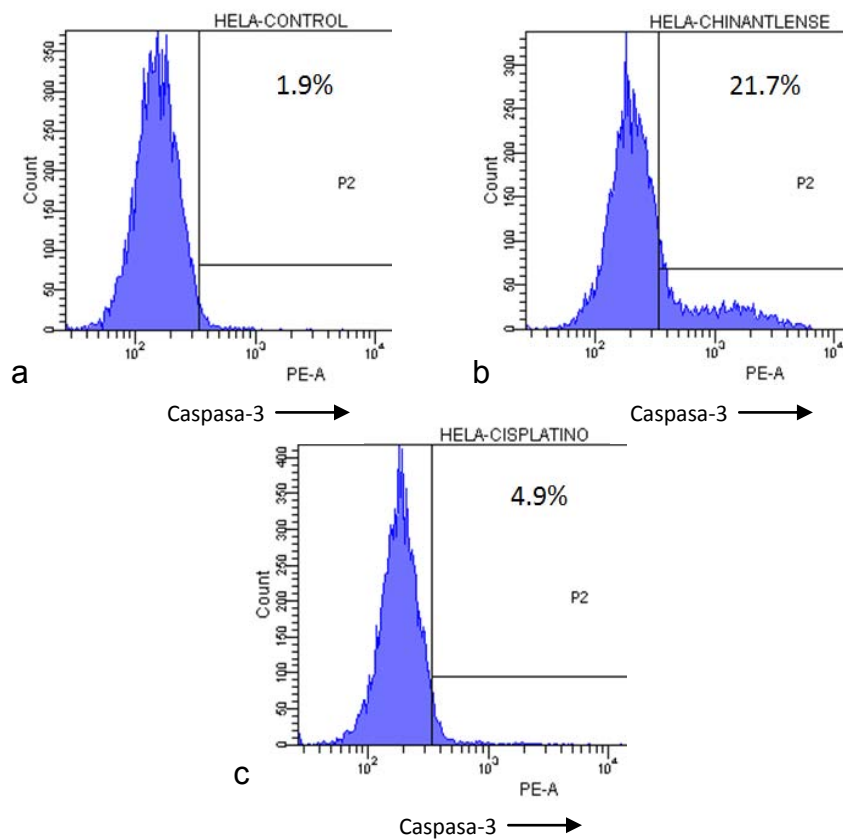


Figura 18. Evaluación de caspasa-3 activa en células HeLa con: a) control, células con la  $IC_{50}$  de b) *S. chinantlense* y c) cisplatino, después de 48 horas de cultivo.

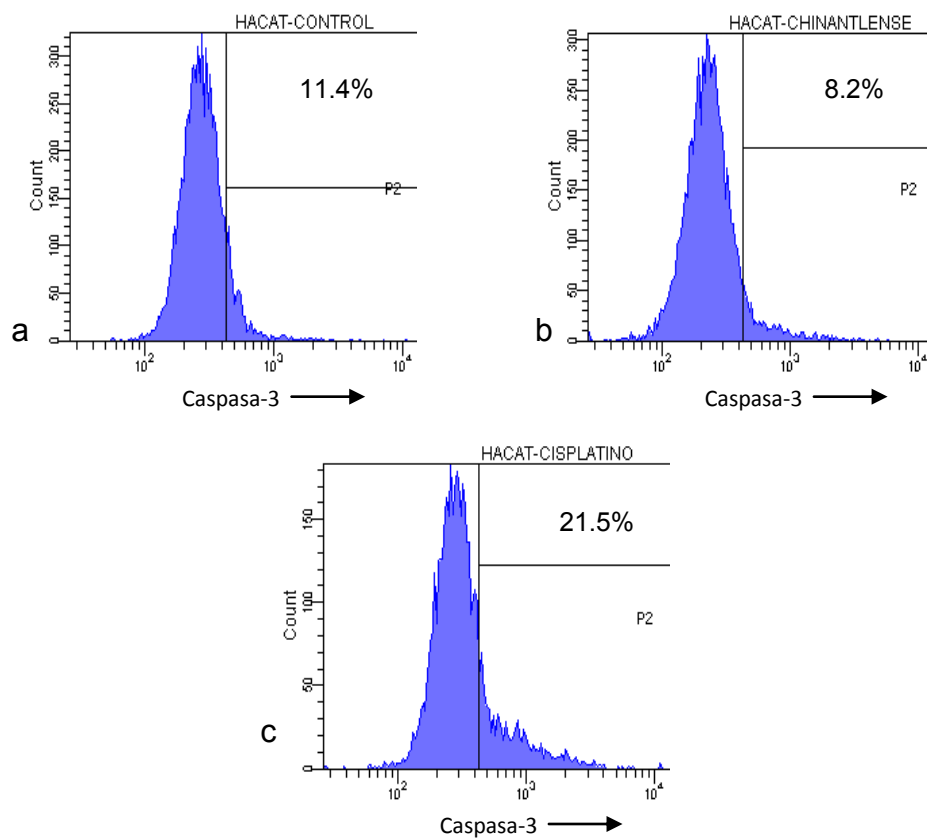


Figura 19. Evaluación de caspasa-3 activa en células HaCaT con: a) control, células con la  $IC_{50}$  de b) *S. chinantlense* y c) cisplatino, después de 48 horas de cultivo.

Tabla 5. Resumen de las evidencias de apoptosis en las líneas celulares HeLa y HaCaT, por efecto de las IC50 del extracto *S. chinantlense* y del antineoplásico cisplatino.

	<b><i>S. chinantlense</i></b>		<b>Cisplatino</b>	
	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT
Activación de caspasa-8	No	No	Si	No
Apoptosis temprana	Si	No	Si	No
Apoptosis tardía	Si	No	Si	Si
Activación de p53	Si	No	No	Si
Liberación de citocromo-c	Si	Si	Si	Si
Activación de caspasa-3	Si	No	No	Si
Fragmentación de ADN	Si	ND	Si	ND

## Discusión

Se ha reportado que el extracto de *S. chinantlense* tiene capacidad para inhibir la proliferación de diferentes líneas celulares tumorales (Rivera-Martínez, 2011), incluso induce la translocación de fosfatidilserina y la fragmentación del ADN en líneas celulares leucémicas (Aguñiga, 2013; Cadena-Zamudio, 2013). Sin embargo, en la línea celular HeLa, proveniente de cáncer de cérvix, sólo se había reportado la inducción de cuerpos apoptóticos pero no se había confirmado el tipo de muerte celular. En este estudio se registró que las concentraciones de IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* (HeLa: 1.82 µg/mL) son inferiores a la concentración reportada que daña a células mononucleadas de médula ósea de ratón normal (3.56 µg/mL) reportado por Aguiñiga (2013), lo cual sugiere ser menos tóxica para un tejido altamente sensible a agentes antineoplásicos que generalmente producen como efecto secundario la supresión de la médula ósea, que se manifiesta con leucopenia, principalmente granulocitopenia, trombocitopenia, anemia y megaloblastosis (Verstappen *et al.*, 2003), comprometiendo la integridad y calidad de vida del paciente.

A este respecto, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos considera que los extractos crudos con IC<sub>50</sub> menor a 20 µg/mL son agentes con potencial anticancerígeno (Boik, 2001), por lo que el extracto de *S. chinantlense* puede considerarse dentro de esta categoría ya que concentración inhibitoria es inferior a dicho rango, e incluso cumple con el criterio para moléculas puras con interés oncológico, cuyo rango de IC<sub>50</sub> debe ser menor a 4 µg/mL (Boik, 2001); rango en el que

se encuentran las de IC<sub>50</sub> de cisplatino presentada en éste trabajo [HeLa: 0.72 µg/mL ]. La IC<sub>50</sub> del extracto *S. chinantlense* está muy por debajo de la actividad de extractos de 76 plantas, incluyendo a *Momordica balsamina* que es una cucurbitacea, empleadas con una concentración de 50 µg/mL sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7, y de los cuales solo 3 especies mostraron un efecto citotóxico con IC<sub>50</sub> alrededor de 20 µg/mL (Abu-Dahab *et al.*, 2007).

Para tener un control de células epiteliales se empleó la línea celular inmortalizada HaCaT, que proviene de epitelio de piel (queratinocitos) humano y es no tumorigénica (Boukamp *et al.*, 1988). Es un modelo ampliamente usado como control de células no tumorigénicas; sobre todo entre líneas celulares epiteliales (Hernández-Flores *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). Se obtuvieron IC<sub>50</sub> menores para la línea HaCaT que para HeLa, tanto del extracto como del cisplatino. Considerando que HeLa proveniente de cáncer de cérvix, puede tener la capacidad de las células transformadas (cancerígenas) para excluir agentes antineoplásicos mediante el mecanismo de resistencia a multidrogas (Pizarro, 2006) dando como ventaja mayor resistencia comparada con las células no tumorigénicas como HaCaT. La inhibición de la proliferación puede ser consecuencia de que las células sufren muerte celular por apoptosis y debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentan diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula, esto permite disponer de diferentes marcadores de la apoptosis (Alfaro *et al.*, 2000) que deben ser considerados para confirmar el proceso, entre ellos la degradación del ADN.

El cisplatino y el extracto inducen en HeLa fragmentación de ADN, fragmentos altamente específicos y frecuentemente utilizado como sello para definir el tipo de



muerte celular programada (De Toro, 2006) con el que se identifica el estado avanzado de la apoptosis (Martínez, 2009). Esta fragmentación es realizada por endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Zhivotovsky *et al.*, 2001; Elmore, 2007). Sin embargo, en las células HaCaT no se pudo observar de forma concluyente la fragmentación del ADN, esto puede deberse a que se dificulta encontrar este tipo de degradación de ADN en algunas estirpes celulares como las epiteliales (Alfaro *et al.*, 2000); además se ha demostrado que no todas las células que mueren por apoptosis van a presentar este tipo de degradación de ADN (Alfaro *et al.*, 2000).

Al evaluar el ciclo celular sobre HeLa, se demostró que el cisplatino reduce evidentemente la población en G1 y aumenta la de SubG1 en 24.1%, lo cual coincide con lo registrado por Mohanty *et al.* (2005) con valores de 19%, bajo las mismas condiciones y células. Sin embargo, el extracto redujo la población en las tres fases del ciclo celular y aumentó la población en SubG1 (46.2%) casi al doble en relación al cisplatino, lo que confirma la reducción del número celular y el ADN fragmentado observado anteriormente en HeLa. En las células HaCaT, el cisplatino ejerce el mismo efecto que en HeLa, es decir, también induce la fragmentación de estas células. Sin embargo el extracto de *S. chinantlense*, sólo redujo la fase celular G1 y aumentó al doble la fase S, lo que sugiere que a la mayoría de las células las detiene antes de completar la división celular y el aumento en la población de SubG1 es ligero, mucho menor de lo que induce a la línea celular HeLa.

Una de las moléculas claves en la regulación del ciclo celular es la proteína p53, que se encuentra en todas las células en estado latente y no es funcional en células que no han sido expuestas a agresiones. Una vez que se detecta daño en el ADN, ésta puede

inducir la detención del ciclo celular y puede activar la apoptosis. En las células HeLa, el extracto *S. chinantlense* aumenta el porcentaje con p53 activo, mientras que en células HaCaT no hay ningún cambio. El cisplatino, indujo activación de p53 en 3% a la línea celular HeLa y en 17.9% en HaCaT, pero el extracto solo indujo cambios en la línea celular HeLa, lo cual sugiere mayor tolerancia en las células no tumorigénicas.

La translocación de fosfatidilserina (PS) desde la cara interna de la membrana hacia la externa, ofrece un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas; siendo éste un fenómeno efectivo para la detección de una célula apoptótica (Zhivotovsky *et al.*, 2001; Elmore, 2007). En la línea tumoral HeLa, a las 72 horas, el cisplatino presentó 54% de población en apoptosis temprana, la cual fue mayor a la observada (10.9%) a las 24 horas (Hernández-Flores *et al.*, 2011). Por el contrario, el extracto incremento mayormente la población en apoptosis tardía, lo que sugiere que el extracto podría estar actuando más rápido en la inducción de apoptosis sobre las células de cáncer de cérvix. Para el caso de la línea no tumoral HaCaT, el extracto no aumentó la población en apoptosis, mientras que el cisplatino sí, lo cual coincide con lo reportado por Hernández-Flores *et al.* (2011), lo que sugiere que el antineoplásico comercial induce mayor apoptosis sobre células no tumorales que en células cancerígenas.

Una vez mostrado que el extracto induce apoptosis en células tumorales fue importante conocer cuál es la vía implicada en este proceso. Para ello se evaluó la vía de señalización extrínseca la cual involucra interacciones mediadas por ligandos unidos a receptores transmembranales (Elmore, 2007) que van a reclutar moléculas adaptadoras para poder así activar a las caspasas iniciadoras como caspasa-8, la cual comienza la señalización para la apoptosis (Martínez, 2009). Se evaluó la activación relativa de

caspasa-8, donde sólo el cisplatino aumento 40% dicha actividad sobre las células HeLa, el cual se ha reportado que incrementa 20% (Hernández-Flores *et al.*, 2011), mientras que el extracto no lo aumentó en ninguna de las líneas celulares, sugiriendo que el extracto no activa esta vía de señalización (extrínseca); cabe considerar que no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso (Alfaro *et al.*, 2000); posiblemente podría ser evaluado a otro tiempo para confirmar si realmente activa a ésta caspasa o confirmar si realmente no actúa por esta vía.

En la vía de señalización intrínseca, específicamente en la mitocondria, existen cambios estructurales en la membrana mitocondrial, lo que conlleva la liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas como el citocromo-c (Elmore, 2007). En ambas líneas celulares, la concentración de citocromo-c aumentó al doble la concentración, por efecto del cisplatino y *S. chinantlense*. Lo que significa que ambos estímulos están afectando la actividad mitocondrial y por tanto activando esta vía apoptótica.

Finalmente ambas vías intrínseca y extrínseca, llegan a la activación de enzimas proteolíticas caspasas; en particular las clasificadas como efectoras, de las cuales se activa principalmente caspasa-3 y ésta a su vez indicará a otras moléculas que entren al núcleo y fragmenten el ADN (Elmore, 2007). Se evaluó la activación de caspasa-3 en las células HeLa, en las cuales el extracto *S. chinantlense* aumentó 20% más que el cisplatino. En células HaCaT, el cisplatino sí aumentó la actividad de caspasa-3, mientras que el extracto no indujo incremento. Se ha reportado que el cisplatino incrementa el porcentaje de actividad de caspasa-3 en 6.2 veces en células HeLa y

aproximadamente a la mitad de dicho porcentaje en células HaCaT (Hernández-Flores *et al.*, 2011), por lo que nuestro resultado coincide con dicho reporte.

El conjunto de resultados presentados a lo largo de las diferentes evaluaciones son evidencia para reconocer que se están llevando a cabo los eventos característicos de la apoptosis en la línea celular HeLa, confirmando lo que el antineoplásico cisplatino ejerce; sin embargo, cabe resaltar que el efecto del extracto de *S. chinantlense* tiene la misma capacidad de inducir la inhibición de la proliferación en células cancerígenas por la apoptosis y particularmente por la vía intrínseca (Tabla 5). Adicionalmente el extracto presenta un efecto selectivo sobre las células no tumorales (HaCaT) a las cuales no induce a la apoptosis, efecto que ya ha sido reportado para este genotipo al ser selectivo sobre células de médula ósea normal de ratón por Aguiñiga (2013) y Cadena-Zamudio (2013), e incluso se ha reportado que aumenta el índice mitótico de dichas células y que no altera el índice esplénico, hepático y tímico de ratones sanos (Gómez, 2013); un caso similar ocurre con la curcumina (*Curcuma longa*), la cual ha demostrado tener efecto anti proliferativo sobre células cancerígenas sin tener un efecto negativo sobre células sanas (Wright *et al.*, 2013).

La actividad del extracto *S. chinantlense* sobre las células puede deberse a la presencia de múltiples metabolitos, que se encuentran en forma de mezcla compleja y que actúan sinérgicamente (Pezzuto, 1997). Tales compuestos son fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos, peroxidasas, esteroides, terpenos y cucurbitacinas (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007, 2013; Aguiñiga, 2013), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, anti-mutagénica, anti-oxidantes, antiviral y efectos antitumorales y antileucémicos (Salama *et al.*, 1986; Yen *et al.*, 2001;

Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2004, Ordoñez *et al.*, 2003, 2006; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007, 2013; Aguiñiga, 2013); cabe mencionar que la actividad anticancerígena de muchas cucurbitáceas se atribuye a la presencia de los triterpenos, específicamente las llamadas cucurbitacinas (Jayaprakasam *et al.*, 2003; Attard *et al.*, 2004; Bartalis *et al.*, 2005; Dantas *et al.*, 2006; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007a; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), que particularmente han mostrado citotoxicidad en diversas líneas celulares tumorales, demostrando ser promisorios agentes antineoplásicos (Ito *et al.*, 2002; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Attard *et al.*, 2004; Bartalis *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007b). Sería relevante saber cuál de esas moléculas es la responsable de dicho efecto y así establecer si el extracto de *S. chinantlense* tiene potencial como antineoplásico.

## Conclusiones

- I. El extracto de *Sechium chinantlense* reduce la proliferación celular de HeLa y HaCaT en forma dependiente de la concentración y de manera similar al cisplatino.
- II. El extracto de *S. chinantlense* y el cisplatino reducen la viabilidad e inducen la formación de cuerpos apoptóticos en las células HeLa y HaCaT; y presenta diferencias respecto al cisplatino al detener el ciclo celular dependiendo si son células HeLa o HaCaT, además ambos induce la liberación de citocromo-c.
- III. El extracto de *S. chinantlense* y el cisplatino inducen la fragmentación del ADN en las células HeLa.
- IV. El extracto de *S. chinantlense* y el cisplatino inducen la translocación de fosfatidilserina en HeLa, pero solo el cisplatino en HaCaT.
- V. Tanto el extracto como el cisplatino inducen la activación de p53, caspasa-3 y caspasa-8 de forma diferenciada entre ambas líneas celulares.
- VI. Los resultados sugieren que el extracto de *S. chinantlense* actúa por la vía intrínseca de la apoptosis y que tiene un efecto diferente entre células tumorales y las no tumorales.
- VII. El extracto de *S. chinantlense* inhibe la proliferación celular de la línea HeLa mediante la inducción de mecanismos apoptóticos y en forma similar al antineoplásico cisplatino.

## Literatura citada

- Abdelnour A., Ramírez C., Engelmann F. 2002. Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía Mesoamericana*, 13:147-151.
- Abu-Dahab R., Afifi F. 2007. Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*, 75(3):121.
- Afifi M. S., Ross S. A., ElSohly M. A., Naeem Z. E., Halaweish F. T. 1999. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chem. Ecol*, 25(4):847-859.
- Aguñiga S.I. 2013. Potencial antileucémico in vitro de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México.
- Alfaro M., García C., Dueñas G. 2000. Métodos de detección de la apoptosis; aplicaciones y limitaciones. *Rev. del INCan*, 46(4):275-280.
- Aljabri M. B. 2006. Downstream gene expression of wild type p53 tumor suppressor gene versus mutated and null p53. Tesis de Maestría. Universidad de Tromso, Noruega.
- Alonso-Castro A.J., Villarreal M. L., Salazar-Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3):945-972.
- Attard E., Cuschier A., Scicluna-Spiter A., Brincat M. P. 2004. The effects of cucurbitacin E on two lymphocyte models. *Pharmaceutical Biology*, 42(2):170-175.
- Bartalis J., Halaweish F.T. 2005. Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Journal of Chromatography B*, 818(2):159-166.
- Boik J. 2001. *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, Pág. 25.

- Borruto F., De Ridder M, editors. 2012. HPV and cervical cancer, achievements in prevention and future prospects. New York: Springer Science. 7-10.
- Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal Cell Biology*, 106(3):761–771.
- Bye R., Estrada E., Linares E. 1992. Recursos genéticos en plantas medicinales de México. In: Estrada, E. (Ed). *Plantas Medicinales de México, Introducción a su Estudio*. 4ª ed. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 362-370.
- Cadena-Iñiguez J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Texcoco. México.
- Cadena Iñiguez J., Arévalo L., Avedaño C., Soto M., Ruíz L., Santiago E., Acosta M., Cisneros V., Aguirre J., Ochoa D. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh Produce*, 1:41-53.
- Cadena Iñiguez J., Soto-Hernández M., Torres-Salas A., Aguiñiga-Sánchez I., Ruiz-Posadas L., Rivera-Martínez A.R., Santiago-Osorio E. 2013. The anti-proliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of Medical Plant Research*, 7:455-46.
- Cadena-Zamudio J. 2013. Inducción de la fragmentación del DNA en líneas celulares leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- 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 Médica Hondureña*, 48(4).
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Molecular Cell Biology*, 8:729-740.
- Cañigüeral S., Dellacassa E., Bandoni A. L. 2003. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3):265-279.



- Che C., X. Fang, Phoebe C., Kinghorn D., Farnsworth N. 1985. High-field <sup>1</sup>H-NMR spectral analysis of some cucurbitacins. *Journal of Natural Produce*. 48:429-434.
- Chen J., Tian R., Qiu M., Lu L., Zheng Y., Zhang Z. 2008. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, 69(4):1043-1048.
- Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A., Barradas M., Benguría A., Zaballos A., Flores J., Barbacid M., Beach D., Serrano M. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436:642-649.
- Cross, H.B. 2003. Evolution, systematics and domestication in *Sechium* and related general (Sicyeae, Cucurbitaceae). Tesis doctoral. Columbia University. U.S.A.
- Dantas I.N., Gadelha G.C.M., Chaves D.C., Monte F.J.Q., Pessoa C., De Moraes M. O., Costa-Cotufo L. V. 2006. Studies on the cytotoxicity of cucurbitacins isolated from *Cayaponia racemosa* (Cucurbitaceae). *Z. Naturforsch C. Biosciences*, 61(9-10):643-646.
- De Toro, G. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. España.
- 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-99m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an in vitro and in vivo analysis. *Pakistan Journal of Nut*, 2(4):221-227.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*, 35(4):495–516.
- Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc*, 2(5):1084-1104.
- 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.

- Gillies R.G., Didier N., Dentosn M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159(1):109-113.
- 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.
- Gómez G.G. 2013. Valoración de parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones sanos tratados con extractos de *Sechium* spp. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- Guppy L.J., Gordon E.A., Nelson M. 2000. The antihypertensive effects of the jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Med. Journal*, 49(1):27-31.
- Hampel B., Wagner M., Teis D., Zwerschke W., Huber L., Jansen-Durr P. 2005. Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell*, 4:325-330.
- Hanahan D., Weinberg A.R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- Hanahan D., Weinberg A.R. 2011. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- Hernández-Flores G., Ortiz-Lazareno P.C., Lerma-Diaz J.M., Dominguez-Rodriguez J.R., Jave-Suarez L.F., Aguilar-Lemarrooy A.C., Celis-Carrillo R., Toro-Arreola S., Castellanos-Esparza Y.C., Bravo-Cuellar A. 2011. Pentoxifylline sensitizes human cervical tumor cells to cisplatin-induced apoptosis by suppressing NF-kappa B and decreased cell senescence. *BMC Cancer*, 11:483.
- Hill M., Adrain C., Duriez P., Creagh E., Martin S. 2003. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo. Journal*, 23:2134-2145.
- Huang L.W., Hsieh B.S., Cheng H.L., Hu Y.C., Chang W.T., Chang K.L. 2012. Arecoline decreases interleukin-6 production and induces apoptosis and cell cycle arrest in human basal cell carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 258(2):199-207.
- Huerta S., Goulet E., Huerta-Yepez S., Livingston E. 2007. Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Res*, 139:143-156.

- Huntly B., Gilliland D. 2005. Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature*, 435:1169-1170.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. 2014. Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer (4 de febrero) Datos Nacionales. Aguascalientes. 1-11.
- Ito A., Chai H.B., Lee D., Kardono L.B.S., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. 2002. Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins of *Elaeocarpus mastersii*. *Phytochemistry*, 61(2):171-174.
- Jayaprakasam B., Seeram N.P., Nair M.G. 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacinas from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett*, 189(1):11-16.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *Cancer Journal Clin*, 61:61-69.
- Jensen L.P., Lai A.R. 1986. Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *Am. Journal Obstet. Gynecol*, 155(5):1048-1049.
- Jiménez L.F., Merchant H. 2003. *Biología celular y molecular*. México. Ed. Prentice Hall. Pp. 664.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*, 22(6):100-106.
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., 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.
- Li D., Ikeda T., Nohara T., Liu J., Wen Y., Sakamoto T., Nonaka G. 2007a. Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *Siraitia grosvenori*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(7):1082-1086.
- Li H., Wang L.J., Qiu G.F., Yu J.Q., Liang S.C., Hu X.M. 2007b Apoptosis of HeLa cells induced by extract from *Cremanthodium humile*. *Food and Chem. Toxicol*, 45(10):2040-2046.

- Ling Y.H., Priebe W., Perez-Soler R., 1993. Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res*, 53(8):1845-1852.
- Lira-Saade R. 1996. Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. *Int. Plant Gen. Resources Inst. Italy*. pp. 58.
- Lira-Saade R., Castrejón J., Zamudio S., Rojas-Zenteno C. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana*, 49:47-61.
- Lizano Soberón M., Carrillo-García A., Contreras-Paredes A. 2009. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología*. 4:205-216.
- Lo Presti A., Aular Y., Morales L., Payares E. 2008. Reacciones adversas renales y hematológicas producidas por cisplatino y carboplatino con concurrente radioterapia en pacientes con cáncer de cuello uterino. *Rev. de la Fac. de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. 12:1.
- Martínez S. M. 2009. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 11(2):152-166.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell*, 11(3):577-590.
- Mohanty S., Huang J., Basu A. 2005. Enhancement of cisplatin sensitivity of cisplatin-resistant human cervical carcinoma cells by Bryostatin-1. *Clin Cancer Res*, 11(18):6730-6737.
- Monroy-Vázquez M.E., Soto-Hernández M., Cadena-Iñiguez J., Santiago-Osorio E., Ruiz-Posadas L.M., Rosas-Acevedo H. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*, 43(8):777-790.
- Morgan S.J., Darling D.C. 1993. Cultivo de células animales. *Acriba. España*. pp. 159.

- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2013. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Nota descriptiva No. 380. [consultado 20 de abril de 2014] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/#>
- OMS [Organización Mundial de la Salud] 2014. Cáncer. Nota descriptiva No. 297; [consultado 18 de abril de 2014] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ordoñez A.A.L., Gómez J.D., Cudmani N.M., Vattuone M.A., Isla M.I. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Microb. Ecol. Health Dis, 15(1):33-39.
- Ordoñez A.A.L., Gómez J.D., Vattuone M.A., Isla M.I. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. extracts. Food Chem, 97(3):452-458.
- 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 fitotecnia. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. pp. 321.
- Ortiz R., Uribe C., Dangond Y. 2004. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. Rev. Col. de Obstetricia y Ginecología, 55:146-160.
- Pardo G., Hernández P., Delgado, R. 2005. La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. Revista Cubana de Medicina, 44(1-2).
- Perales S. 2005. Proliferación y apoptosis ne células de musculo liso arteriales en cultivo. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. España.
- Pezzuto J.M. 1997. Plant-derived anticancer agents. Biochem. Pharm, 53:121-133.
- Pizarro A. 2006. Glicoproteína P como factor pronóstico y objetivo terapéutico en pacientes con leucemia mieloide aguda. Curso Teórico y Seminarios de Oncología Básica. Medwave. Ed. Oct. Chile.
- Ramírez-Sánchez S., Rivera G. 2014. Efecto a nivel celular y molecular de agentes antitumorales. Acta Universitaria, 24(4):15-20. doi: 10.15174.au.2014.567.

- 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. FES-Zaragoza, UNAM.
- Rubio-Moscardo F., Blesa D., Mestre C., Siebert R., Balasas T., Benito A., Rosenwald A., Climent J., Martínez J.I., Schilhabel M., Karran E.L., Gesk S., Esteller M., De Leeuw R., Staudt L.M., Fernandez-Luna J.L., Pinkel D., Dyer M.J., Martinez-Climent J.A. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106:3214–22.
- 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*. *Rev. Col. de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 15:79-82.
- Setzer W.N., Setzer, M.C. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Reviews in Med. Chem*, 3(6):540-556.
- Schlaepfer L., Mendoza-Espinoza J.A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4):18-27.
- 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. *Journal Agric. Food Chem*, 52(21):6510-6515.
- Sosa H.N.A. 2008. Evaluación del efecto de extractos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) sobre la proliferación y citotoxicidad en las líneas celulares tumorales L929 y HeLa. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
- Tallamy D.W., Krischik V.A. 1989. Variation and function of cucurbitacins in Cucurbita: an examination of current hypotheses. *The Am. Naturalist*, 133(6):766-786.
- The American Type Culture Collection [ATCC], The Global Bioresource Center. Disponible en: [www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas.asp](http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas.asp)

- Tiburcio F.R. 2011. Efecto de los extractos crudos de especies silvestres de *Sechium* spp. (*S. Chinantlense* (Lira y 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. UNAM. México.
- Van Engeland M., Ramaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P. 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24(2):131-139.
- Vega A.E., Velasco L.R., Jiménez E.M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*, 31(3):97-111.
- Verstappen C., Heimans J., Hoekman K., Postma J. 2003. Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management. *Drugs*, 63:1549-1563.
- Vicencio J., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Younes A., Maiuri M., Lavandro S., Kroemer G. 2008. Senescence, Apoptosis or Autophagy?. *Gerontology*, 54:92-99.
- Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573):1635-1636.
- Wang D.C., Xiang H., Li D., Gao H., Cai H., Wu L.J., Deng X.M. 2008. Purinecontaining cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv. *dayangua*. *Phytochemistry*, 69(6):1434-1438.
- Wright L.E., Frye J.B., Gorti B., Timmermann B.N., Funk J.L. 2013. Bioactivity of turmeric-derived curcuminoids and related metabolites in breast cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34):6218-6225.
- Wu T.H., Chow L.P., Lin J.Y. 1998. Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. purification, characterization, molecular cloning and expression. *Eur. Journal Biochem*, 255(2):400-408.
- Wu P.L., Lin F.W., Wu T.S., Kuoh C.S., Lee K.H., Lee S.J. 2004. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. *Chem. And Pharmaceutical Bulletin*, 52(3):345-349.

- 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 involved in catalysis, magnesium coordination, and substrate specificity. *Journal of Biomedical Science*, 16:614-625.
- Yen G.C., Chen H.Y, Peng H.H. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxic*, 39(11):1045–1053.
- Zhivotovsky B., Orrenius S. 2001. Current Concepts in Cell Death. In: Wiley, J. & Sons (Eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.1.1-18.1.18.