

04-020

BIOPROSPECTIVE MANAGEMENT OF PLANT GENOTYPES FOR THE DEVELOPMENT OF DRUGS FOR DISEASES OF PUBLIC INTEREST

Cadena Zamudio, Jorge David (1); Santiago Osorio, Edelmiro (2); Aguiñiga Sanchez, Itzen (3); Iñiguez Luna, Maria Isabel (4); Cadena Zamudio, Daniel Alejandro (5)

(1) Instituto De Ecología A.C., (2) Hematopoiesis and Leukemia Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, (3) Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, (4) Instituto de Ecología A.C., Red de Biología Evolutiva, Red de Estudios Moleculares Avanzados, (5) Instituto de Ecología

The search for natural sources to treat chronic diseases (cancer) has led to bioprospective evaluations of plant species with cytotoxic activity due to their secondary metabolites. The cytotoxic potential of plant extracts of the *Sechium* sp. genus in inducing cell death by apoptosis was evaluated. Extracts of three genotypes were evaluated, in two myeloid cell lines (J774 and P388) and normal CD-1 mouse hematopoietic cells, to show that the extracts induce cell death by apoptosis and not by a different one, since this process involves the oligonucleosomal fragmentation (180 to 200 bp) of genomic DNA as an important and irreversible biological marker of the process. The evaluation indicated a decrease in the density of leukemia cell lines in a differentiated manner between extracts; detection in the translocation of the phospholipid phosphatidylserine (PS), as an indicator of the "early" apoptotic process in both cell lines, and cell death by apoptosis through the fragmentation of genomic DNA (oligonucleosome fragments in cell lines of mice with leukemia, but not in normal hematopoietic cells). The extracts expressed phosphatidylserine and induced DNA fragmentation causing cell death by apoptosis, which suggests its therapeutic application. Genotypes are currently exploited massively with rural producers.

Keywords: "Cancer"; "vegetable extracts"; "apoptosis"; "DFF40/CAD"; "DFF45/ICAD"

GESTIÓN BIOPROSPECTIVA DE GENOTIPOS VEGETALES PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS DE ENFERMEDADES DE INTERÉS PÚBLICO

La búsqueda de fuentes naturales para tratar enfermedades crónicas (cáncer) ha llevado a realizar evaluaciones bioprospectivas de especies vegetales con actividad citotóxica por sus metabolitos secundarios. Se evaluó el potencial citotóxico de extractos de plantas del género *Sechium* sp., en la inducción de muerte celular por apoptosis. Extractos de tres genotipos fueron evaluados, en dos líneas celulares mieloides (J774 y P388) y células hematopoyéticas normales de ratón CD-1, para demostrar que los extractos inducen la muerte celular por apoptosis y no por otra diferente, ya que este proceso implica la fragmentación oligonucleosomal (180 a 200 pb) del ADN genómico como marcador biológico importante e irreversible del proceso. La evaluación indicó disminución en la densidad de las líneas celulares de leucemia de manera diferenciada entre extractos; detección en la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS), como indicador del proceso apoptótico "temprano" en ambas líneas celulares, y muerte celular por apoptosis a través de la fragmentación del ADN genómico (fragmentos oligonucleosomas en líneas celulares de ratones con leucemia, pero no en células hematopoyéticas normales). Los extractos expresaron fosfatidilserina e indujeron fragmentación del ADN provocando muerte celular por apoptosis, lo que sugiere su aplicación terapéutica. Actualmente se explotan los genotipos masivamente con productores rurales.

Palabras clave: "Cáncer"; "extractos vegetales"; "apoptosis"; "DFF40/CAD"; "DFF45/ICAD"

Correspondencia: Jorge David Cadena Zamudio; jorge.cadena@posgrado.ecologia.edu.mx

Agradecimientos: Hematopoiesis and Leukemia Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México



1. Introducción

México ha firmado tratados internacionales relacionados con la conservación y manejo (gestión ambiental) de recursos genéticos de la agrobiodiversidad. Dentro de los objetivos están la conservación *in situ*, uso-potenciación y desarrollo de capacidades a usuarios. Lo anterior es con base en el Plan mundial de la FAO, cuya derivación es el Plan Nacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la alimentación y agricultura (RFAA). Para lograr lo anterior, se involucra la actividad de incremento a la caracterización, ya que, si un recurso no se usa, tiene mayor riesgo de perderse. Para derivar proyectos productivos que promuevan el uso de los RFAA subutilizados, se deben realizar estudios que aporten valores de uso distintos a los alimenticios, ya que muchas variantes biológicas locales no son comestibles; sin embargo, representan el acervo genético más próximo a las variantes cultivadas. La gestión ambiental de un RFAA a través de la caracterización bioprospectiva, favorece su conservación y potenciación por descubrimiento de actividad biológica, que incide en nuevos proyectos de desarrollo rural.

A este respecto, los parientes silvestres de *Sechium P. Br.*, son RFAA especialmente frágiles por su carácter amargo debido a el contenido de metabolitos secundarios que impiden su consumo como alimento; sin embargo, la caracterización, evaluación y validación de éstos, permite orientar su rescate y puesta en cultivo para la industria farmacológica. Uno de estos aspectos prospectivos es la evaluación de índices apoptóticos celulares para el tratamiento no invasivo de enfermedades de interés público, tales como el cáncer.

Muchos productos farmacéuticos de uso cotidiano han tenido su origen en estudios prospectivos para determinar nuevos aprovechamientos. Por ello en este trabajo se muestran los avances de investigación prospectiva de cuatro genotipos de *Sechium* con el fin último de diseñar en el mediano plazo un proyecto de ingeniería de producción, proceso y formulación de un suplemento alimenticio en primer orden que guarde las expectativas de “ingredientes activos”.

1.1. Apoptosis

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica (Arango *et al.*, 1997) en la cual los cambios nucleares son los rasgos más característicos, como la condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, y durante el proceso final ocurre la degradación del ADN cromosomal en unidades oligonucleosomales, lo que produce un patrón de “cromatina en escalera” que es un marcador bioquímico prominente de células apoptóticas (Wyllie, 1980; Liu *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2009; Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2013; Sánchez-Osuna *et al.*, 2014; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015) y la formación de fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Cohen, 1993; Wyllie *et al.*, 1984).

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico en cual se presentarán diferentes características, existen estímulos y momentos clave que activan proteínas y enzimas para desencadenar la cascada apoptótica, (Roseto y Brenner, 1999). Uno de los principales iniciadores de este proceso es la activación de caspasas, pero desafortunadamente no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso, debido a lo cual, la apoptosis no debe considerarse sinónimo de muerte celular programada, ya que existen otros tipos de muerte celular programada que no tienen las características morfológicas de la apoptosis, y tampoco debe considerarse sinónimo de activación de caspasas, ya que la activación puede estar asociada a procesos biológicos no letales, aunque para la adquisición de las características apoptóticas se requiera de las caspasas (Kroemer *et al.*, 2009; Wyllie, 1980; White, 1996; Kerr *et al.*, 1972).

1.2. Fragmentación de ADN

La fragmentación del ADN fue identificada por vez primera en 1980 por Wyllie (1980), quien observó que al tratar timocitos de rata con glucocorticoides se inducía una degradación del ADN genómico en fragmentos nucleosomales de doble cadena. El factor responsable de esta actividad fue designado como DFF (factor de fragmentación del ADN) o posteriormente denominado CAD (AADNsa activada por caspasas, o endonucleasa activada por caspasa). El factor de fragmentación (DFF) está compuesto por dos subunidades de 40 y 45-kDa llamadas DFF40/CAD y DFF45/ICAD (Kitazumi y Tsukahara, 2011) los cuales funcionan como una endonucleasa específica de doble cadena responsable del rompimiento de los espacios nucleosomales y la subsecuente condensación de la cromatina durante la apoptosis (Samejima *et al.*, 1998; Eui-Jeon *et al.*, 2004; Callus y Vaux, 2007; Samejima *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 1998; Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2012).

El CAD forma un complejo con su inhibidor ICAD, el cual existe en dos variantes alternativas: la forma larga ICAD-L (conocida como DFF45) y la forma corta ICAD-S (DFF35) (Eui-Jeon *et al.*, 2004) la cual debe ser procesada por la caspasa-3 para que CAD se active; ya que DFF45 no puede solo ser cortada por la caspasa-3, sino también puede ser cortada por la caspasa-7 y la gransyma B, aunque con menor eficacia que la caspasa-3 (Widlak, 2000; Liu *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 2003). En su forma inactiva, DFF es un heterodímero denominado DFF40/CAD/CPAN y DFF45/ICAD. DFF45 juega un doble papel como chaperona inhibidora de DFF40, pues se ha demostrado que la expresión de DFF40 en varios sistemas en la ausencia de DFF45 coexpresada, resulta en la generación de agregados inactivos de DFF40, lo que sugiere que DFF45 es requerida para el apropiado doblamiento de DFF40 activo durante su síntesis (Steller, 1995; Widlak, 2000). DFF40 ataca la cromatina en las uniones internucleosomales del ADN, generando fragmentos mono y oligonucleosomales, de esta manera DFF genera el patrón en forma de escalones en el ADN; cuando DFF es activado se inicia la fragmentación del ADN en un proceso de dos pasos, en el que el ADN se escinde primero en pares de fragmentos (kbp) de 50-300-kilobases, un evento también conocido como degradación del ADN de alto peso molecular (por sus siglas en inglés high molecular weight HMW) (Walker y Sikorska, 1997), seguido por la degradación del ADN en pequeños fragmentos oligonucleosomales (por sus siglas en inglés low molecular weight (LMW) (Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2012), que tienen un tamaño de 0.2 kb, también llamado "escalera de ADN" (Liu *et al.*, 1998; Widlak, 2000; Sánchez-Osuna *et al.*, 2014).

Se sabe que DFF40/CAD presenta una extraordinaria preferencia para escindir en las regiones internucleosomales. Esta preferencia se debe a la estructura similar a unas tijeras del sitio activo DFF40/CAD, por lo cual tiene alta afinidad por el ADN enlazador, la cual mejora considerablemente cuando se lleva a cabo la unión de la histona H1 a la enzima. Además, la unión y activación de DFF40/CAD por la topoisomerasa II puede ser la responsable de la orientación en el corte de 50 a 300 kb en los eventos de escisión de dominios de bucle cromosómico que ocurren durante la fragmentación cromosómica en células apoptóticas (Steller, 1995; Widlak, 2000; Widlak y Garrard, 2005).

1.3. Metabolitos secundarios

Por lo anterior, la búsqueda de fuentes naturales para tratar enfermedades crónicas como el cáncer ha llevado a realizar evaluaciones bioprospectivas de especies vegetales con actividad citotóxica por sus metabolitos secundarios, con el fin de identificar apoptosis, fragmentación de ADN y especificidad entre células sanas y malignas. En este estudio, se evaluó el potencial citotóxico de extractos de plantas del género *Sechium* sp., en la inducción de muerte celular por apoptosis.

2. Materiales y métodos

La investigación se realizó utilizando dos líneas celulares mieloides leucémicas (P388 y J774) y células de médula ósea de ratón CD-1, sometidas a tratamientos con un antineoplásico comercial citarabina "Ara-C" (5 µM) y cuatro extractos vegetales obtenidos de tres genotipos silvestres del género *Sechium* spp. un comestible (*S. edule* var. *nigrum spinosum*) y dos parientes silvestres (*Sechium compositum*, *Sechium chinantlense*) y un híbrido (H 387) para

obtener ADN genómico de cada una de las líneas celulares e identificar un patrón de daño (“en escalera”) a través de electroforesis y evidenciar la muerte por apoptosis como resultado de los tratamientos aplicados, así como, la posible selectividad celular de los extractos. También se realizó la detección de apoptosis temprana por medio Anexina V, a través de citometría de flujo en un citómetro (BD Facsaria II).

2.1. Cultivo de líneas celulares mieloides leucémicas

Las líneas celulares se obtuvieron a través de la American Type Culture Collection (ATCC) las cuales se cultivaron con el medio Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium (IMDM) (Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL NY, USA), y posteriormente se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ y humedad saturante, manteniendo una densidad celular para P388 1x10⁵ cel·ml⁻¹, J774 5x10⁴ cel·ml⁻¹, con resiembra cada 48 horas, momento donde alcanzó un promedio del 70% de saturación y fueron resembradas (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan *et al.*, 1993).

2.2. Procedimiento de dosificación

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

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

Se usaron ratones clínicamente sanos de la cepa CD1, que fueron sacrificados por dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco BRL, USA). Posteriormente se separaron las CMN mediante un gradiente de densidad (ficol densidad=1.077 g·ml⁻¹) (Sigma, St Louis, USA). Por último, se cultivaron las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e Interleucina 3 recombinante de ratón, a una densidad de 100,000 cel·ml⁻¹ en placas de 5ml (Corning NY, USA). Después de cuatro días de cultivo, las células fueron estimuladas con la IC₅₀ más alta de cada uno de los extractos de *Sechium* spp., al tiempo más alto de estímulo utilizado en las líneas celulares leucémicas (68 horas para 774); para ello se utilizó como primera condición, a células control (sin estímulo, y sin PBS) y PBS como vehículo.

2.4. Genotipos de *Sechium* spp.

Se utilizaron extractos de cuatro genotipos de *Sechium* P. Br., uno comestible y tres amargos. La extracción fitoquímica se realizó de acuerdo con Cadena-Iñiguez *et al.* (2011) e Aguñiga-Sánchez *et al.* (2015) a partir de frutos frescos. Las concentraciones de extracto para el cultivo de CMN fueron: H-387 07 (1.38 µg·ml⁻¹); *S. edule var. nigrum spinosum* (1.18 mg·ml⁻¹); *S. compositum* (1.96 µg·ml⁻¹); *S. chinantlense* (0.98 µg·ml⁻¹); tomando como control positivo Citarabina® (5 µM).

2.5. Análisis de apoptosis temprana a través de la detección de Fosfatidilserina

Las células leucémicas y de ratón se cultivaron y trataron bajo las condiciones antes descritas. Después de los respectivos tiempos de cultivo bajo el estímulo de los extractos de *Sechium* spp., se analizaron mediante el Kit de Anexina V (BD pharmagen™ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit). Brevemente, las células fueron lavadas con solución buffer de fosfatos y se

realizó un conteo celular, posteriormente se agregó buffer de Anexina V; se tomaron estas células y se colocaron en un tubo falcon de 5 mL, subsecuentemente se agregó isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual es positivo para células que se encuentren en apoptosis temprana, y células que están en apoptosis tardía, o muertas, ya sea por apoptosis o necrosis. Hecho lo anterior se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad; posteriormente se agregó buffer de Anexina V y se colocaron en oscuridad y hielo. Finalmente se analizaron por citometría de flujo en un citómetro (BD Facsaria II) antes de una hora.

2.6. Análisis de la fragmentación del ADN oligonucleosómico

Las líneas celulares leucemias y células normales de ratón fueron cultivadas en las condiciones antes descritas, y estimuladas con la IC₅₀ de los tratamientos (extractos vegetales) para cada línea celular a sus respectivos tiempos (48, 60, 68 h). Se colectaron por centrifugación convencional a 1500 revoluciones por minuto (rpm). Se agregó 600 µL de buffer de lisis y 20 µL de la solución stock (4 mg mL⁻¹) de proteinasa K (Promega Madison, WI, USA), se incubó a 37 °C por 4 h. Posteriormente se adiciono 7.5 µL de RNAsa (Sigma-Aldrich, USA) y se incubo durante una hora a 37 °C. Se adiciono 0.9 mL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y posteriormente se agregó 0.3 mL de cloroformo-fenol-alcohol isoamílico y se centrifugó a 18000 rpm a 4 °C. Hecho lo anterior se transfirió la fase superior (acuosa) a un tubo eppendorf nuevo con 600 µL de isopropanol a 4 °C (Sigma-Aldrich, USA) se centrifugo y se decantó el sobrenadante. Se agregó 30 µl de buffer TE para hidratar el pellet. El ADN obtenido fue corrido en gel de agarosa UltraPure™ Agarose (Invitrogen) al 1.5% y teñido con 40 µL del stock (0.5 µg mL⁻¹) de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en una cámara de electroforesis (Gibco BRL, Horizon® 58) y analizado en el transiluminador (Foto/Eclipse™, FotoDyne).

3. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación de los extractos mostraron que existe reducción de la densidad celular en las líneas leucémicas mieloides de ratón P388 y J774, (observadas bajo el microscopio de luz a 10X) después 68 y 60 horas respectivamente, comparadas con el control positivo y el vehículo, en presencia de la IC₅₀, registrando reducción de la densidad celular cercana a la inducida por el antineoplásico comercial Ara-C (Citarabina®) (Figura 1 y 2).

Los resultados obtenidos posterior al uso de las concentraciones más elevadas de los extractos vegetales en las células normales de médula ósea de ratón, **mostró** que la proliferación de las células mononucleadas de médula ósea normal de ratón se reduce notablemente solo en Ara-c® y *Sechium edule var. nigrum spinosum* (Figura 3 A, B).

En los casos particulares del Híbrido H-387-07, *S. compositum* y *S. chinantlense* (Figura 3 D, F, G) se observó que la densidad celular es muy parecida a la de los controles (Figura 3 A, B), lo cual podría ser indicativo de que dichos extractos no afectan en gran medida la proliferación de células normales. Respecto a *S. edule var. nigrum spinosum* (Figura 3 E), aun cuando se observa que reduce la densidad celular en células normales, no alcanza los niveles de reducción observadas en las líneas leucémicas observadas en las Figuras 1 E, 2 E.

Figura 1: Línea celular J774. Reducción de la densidad celular en J774 observada bajo el microscopio (10X) después de 68 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule var. nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.

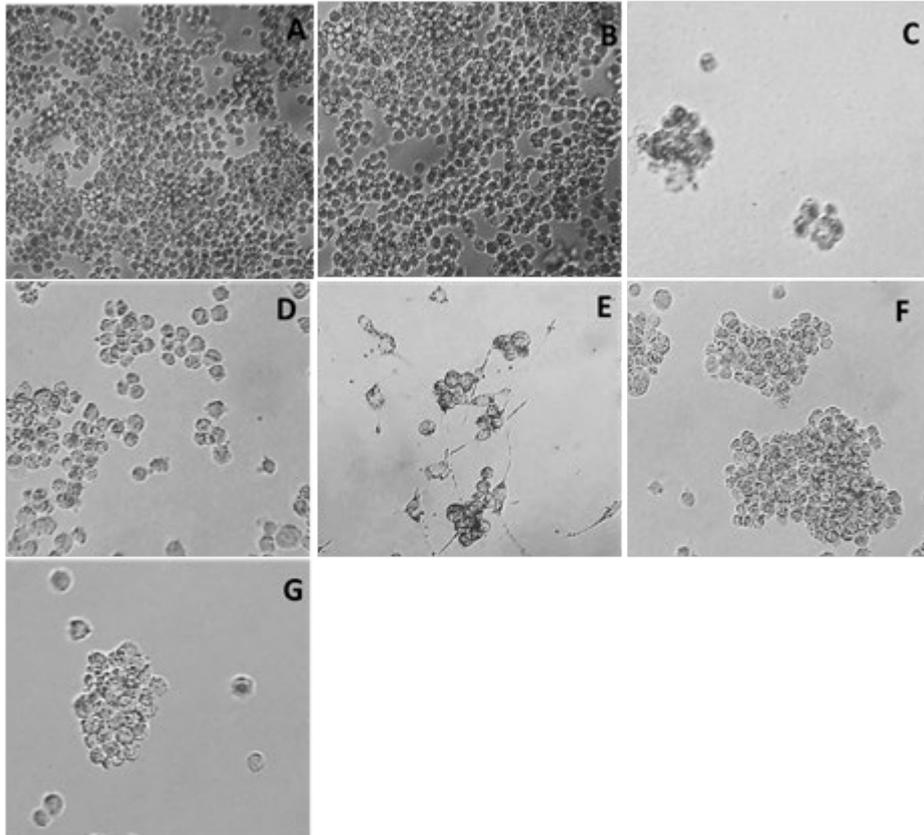
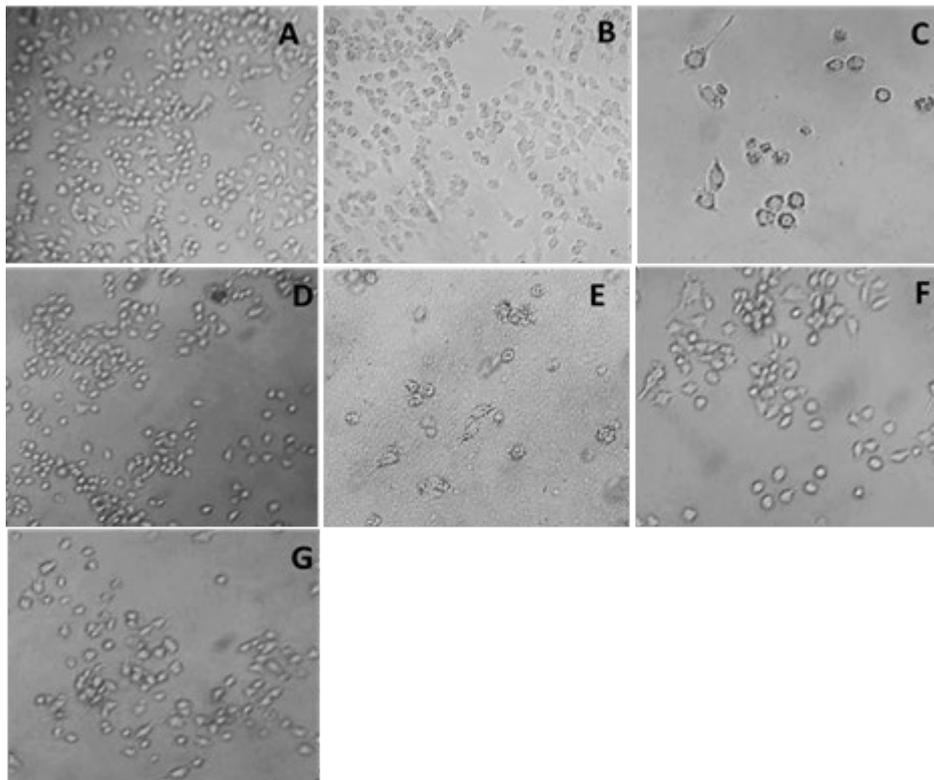


Figura 2: Línea celular P388. Reducción de la densidad celular en P388 observada bajo el microscopio (10X) después de 60 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule* var. *nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.



3.1. Análisis por citometría de flujo

Al evaluar por citometría de flujo, la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS), se observó que las células del control y vehículo, se agruparon en el cuadrante Q3 que indica ausencia de translocación de PS, lo cual se interpreta como células viables (sin tratamiento), mientras que con la adición de la IC₅₀ experimental de cada extracto vegetal, la población migra al cuadrante Q4 y Q2 que representan translocación de PS, indicativo de apoptosis temprana o tardía respectivamente (Figuras 3 y 4, D, E, F, G).

Respecto a la línea celular J774 y P388 en la condición de *S. edule var. nigrum spinosum*, se observó que la población de células positivas para PS migró a la región Q2 que indica apoptosis tardía. Una posible explicación a ello es debido a la reducida densidad celular, ya que el extracto de este genotipo tenía la concentración más alta y por lo tanto el daño causado a células fue mucho más grave. Otro punto para destacar es que los datos obtenidos por el citómetro de flujo indicaron que al menos el 50% del total de la población en ambas líneas celulares tratadas con los extractos, se encontraban en un proceso de apoptosis ya sea temprana (Q4) o tardía (Q2) (Tabla 2 y 3).

Figura 3: Línea celular J774. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células J774 a las 68 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule var. nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*

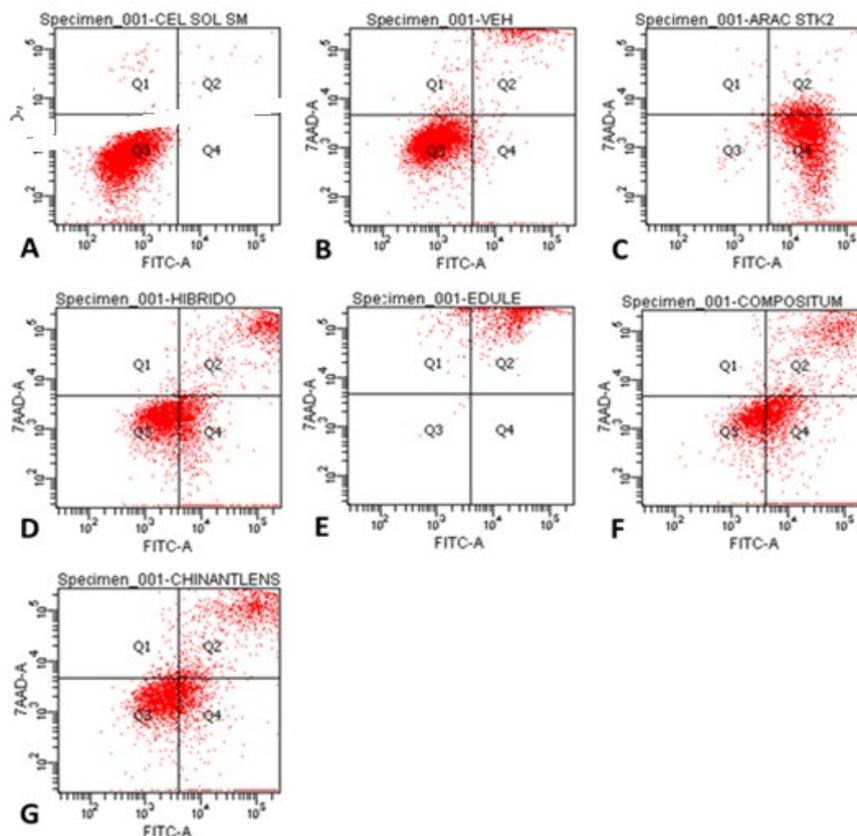


Tabla 1: Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células J774 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas

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

Figura 4: Línea celular P388. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células P388 a las 60 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule* var. *nigrum spinosum* F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.

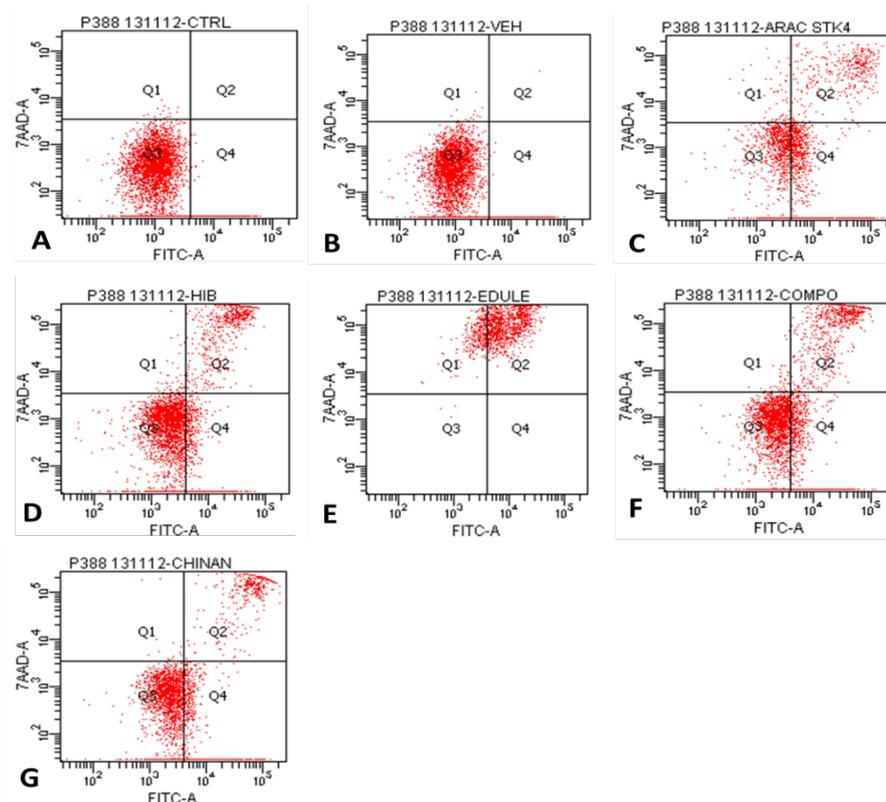


Tabla 2. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células P388 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.

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

En cuanto a las células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1, el análisis de translocación de PS, con citometría de flujo, mostró que en todas las condiciones los extractos vegetales dan lugar al inicio de la apoptosis, puesto que en todas las condiciones evaluadas se registró un porcentaje de células positivas para Anexina V (cuadrantes Q4 y Q2) (apoptosis temprana y tardía respectivamente) (Figura 5 A, B, C, D, E, F, G) y (Tabla 5).

Figura 5: Células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1. Detección de la expresión de fosfatidilserina en células P388 a las 60 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule* var. *nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.

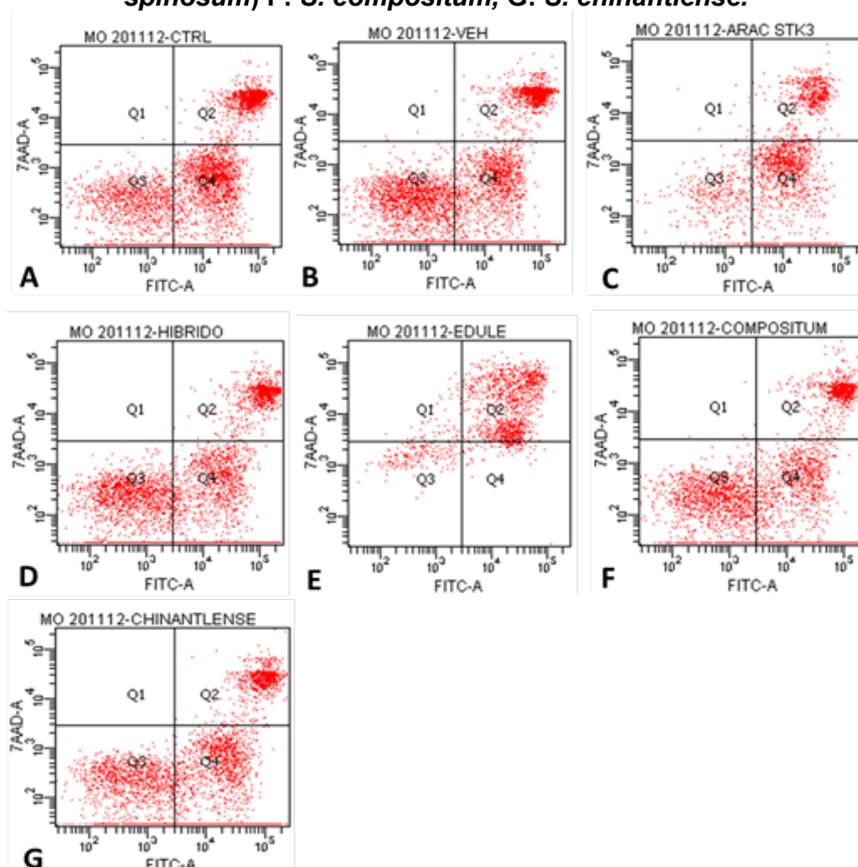
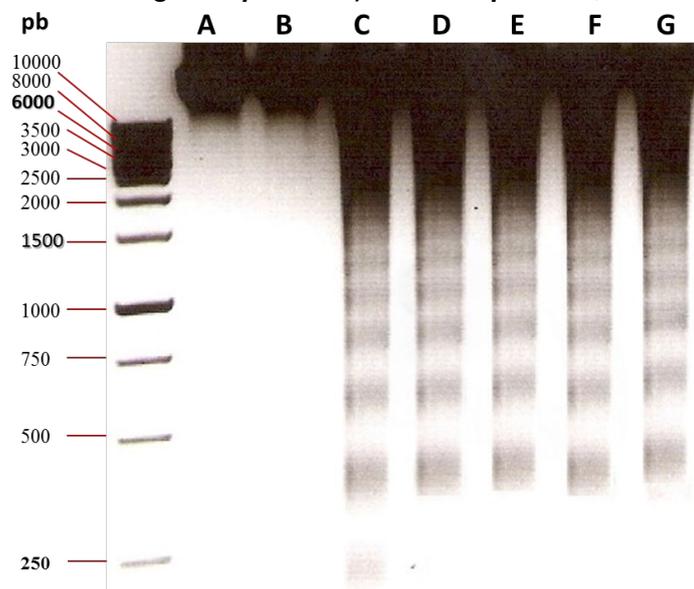


Tabla 3: Células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1. Porcentaje de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V unida a PS por cuadrante, en células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 para cada uno de los tratamientos. Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos (células) cuestionadas.

Tratamientos	Células presentes por cuadrante (%)			
	Q1	Q2	Q3	Q4
Control	0.1	25.1	24.2	50.7
Vehículo	0.1	21.9	37.0	41.1
Ara-c®	0.4	24.7	15.1	59.8
Híbrido 387-07	0.0	20.8	35.2	43.9
<i>S. edule var. nigrum spinosum</i>	3.2	77.7	11.4	8.3
<i>Sechium compositum</i>	0.1	19.2	35.7	45.0
<i>Sechium chinantlense</i>	0.0	17.6	30.2	52.2

La inducción de la fragmentación del ADN es considerada como la técnica por excelencia para la detección de apoptosis (Taylor *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2012; Samejima *et al.*, 2014), dado que el proceso apoptótico tiene la capacidad de ser reversible, siempre y cuando no llegue al punto donde el ADN es fragmentado, el cual es un punto de no retorno para la célula, y por tanto evidencia definitiva de muerte por apoptosis (Tang *et al.*, 2009; Bacsó *et al.*, 2000; Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2013; Sánchez-Osuna *et al.*, 2014). La aplicación de los extractos vegetales a las células J774 y P388, indujeron fragmentación de ADN, debido a que se expresó un patrón en “escalera” (Wyllie, 1980), el cual indica que, bajo las condiciones del presente estudio, los extractos llevan a las células a un punto de daño irreversible (Figura 6 y 7); y por consecuencia a un proceso de apoptosis completo. El patrón en “escalera” fue formado por fragmentos oligonucleosomales de múltiplos entre 180 a 200 pares de bases (pb), lo cual es un marcador bioquímico prominente de células apoptóticas (Wyllie, 1980; Samejima *et al.*, 2014; Sánchez-Osuna *et al.*, 2014) (Figura 6 y 7).

Figura 6: Fragmentación internucleosomal del ADN de células J774 a las 68 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule var. nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.



Después de observar que los extractos indujeron la translocación de PS en células normales, fue imprescindible evaluar si los extractos llevan a las células normales de médula ósea a fragmentación del ADN. Lo que se observó es que los extractos vegetales no tienen efecto alguno sobre el material genético de las células normales de médula ósea normal de ratón, pues se observa que, en ninguna de las concentraciones de los extractos vegetales empleados se indujo la fragmentación del ADN, con excepción del antineoplásico comercial Ara-c® (Figura 8).

Figura 7: Fragmentación internucleosomal del ADN de células P388 a las 60 h de estímulo con la IC₅₀ de los extractos vegetales de *sechium* spp., A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de fragmentación internucleosomal del ADN, D: Híbrido H-387-07, E: *S. edule* var. *nigrum spinosum*) F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.

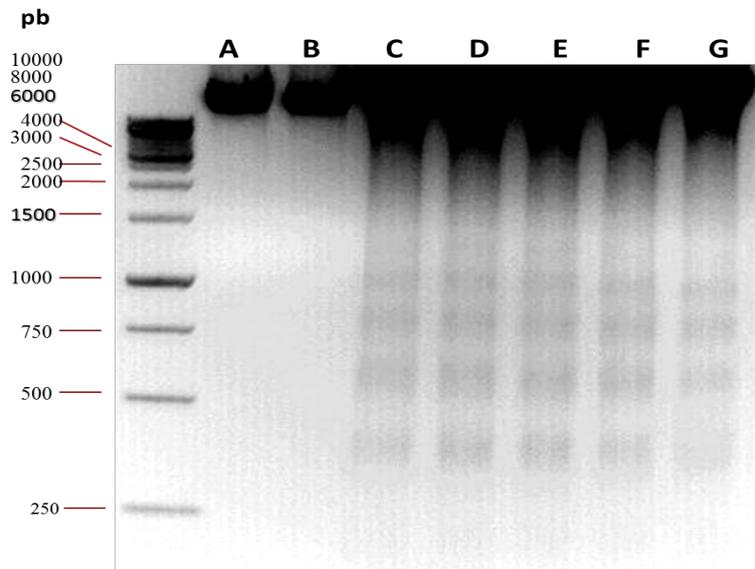
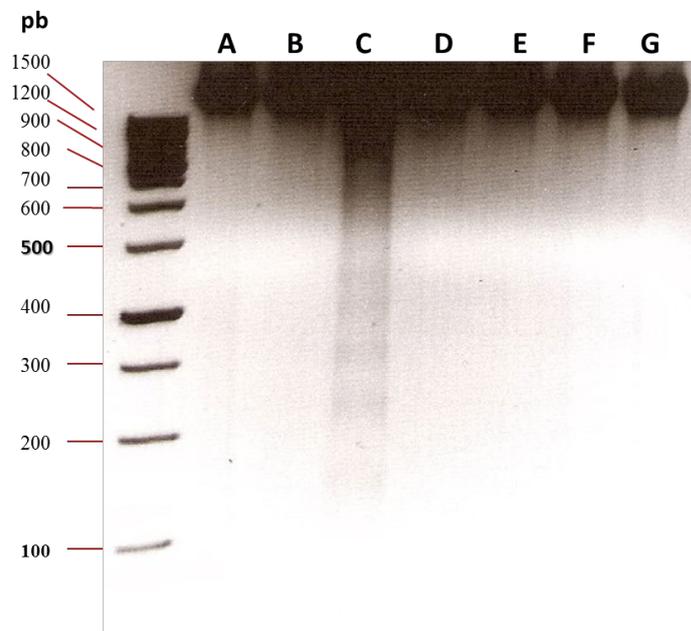


Figura 8: Fragmentación internucleosomal del ADN después de 68 h de estímulo con las IC₅₀ más altas de cada uno de los extractos vegetales de *sechium* spp. de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón CD-1 de A: Control, B: Vehículo (PBS), C: Ara-C (Citarabina®) (5 µM) como control de inhibición de la proliferación, D: Híbrido H-387-0, E: *S. edule* var. *nigrum spinosum* F: *S. compositum*, G: *S. chinantlense*.



considerando que todos los extractos indujeron la translocación de PS en todas las condiciones en células normales (Figura 5), se esperaría que al extraer el ADN, este estuviera fragmentado, pues las poblaciones celulares se encontraron agrupadas en los cuadrantes positivos para muerte celular por apoptosis (Q4 y Q2) al igual que en las líneas celulares leucémicas, pero los resultados indicaron lo contrario, pues el material genético de las células

normales se observó íntegro, lo que indica que estas células no sufrieron muerte celular por apoptosis.

La gran cantidad de células positivas para PS, detectada en el análisis de citometría de flujo, se puede explicar, ya que una célula que tiene comprometida su viabilidad transloca PS, pero esto no indica que las células mueran inmediatamente por apoptosis ya que los mecanismos de reparación celular pueden revertir el daño y evitar la fragmentación de ADN (Bacsó *et al.*, 2000; Colin-Valenzuela *et al.*, 2010); además se sabe que PS puede estar también presente de manera basal, en la superficie de los exosomas derivados de plaquetas, células dendríticas, monocitos viables, en la superficie de los macrófagos maduros y en las células B activadas; también es conocido que células normales como los macrófagos expresan PS de manera basal, incluso más que las propias J774 (Chaurio *et al.*, 2009; Callahan *et al.*, 2000), razón por la cual no se detecta PS basal en J774 pero sí en células normales (Figuras 3, 4, 5).

El hecho de que diferentes extractos de *sechium* spp., induzcan la translocación de la PS y a la fragmentación del ADN, sugiere que la caspasa-3, o 7 estuvieron presentes en su forma activa, ya que ambos marcadores bioquímicos necesitan forzosamente de la activación y ejecución de estas caspasas para expresarse en las células apoptóticas; principalmente la caspasa-3, la cual es la principal responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (Lin *et al.*, 2009; Widlak, 2000; Chaurio *et al.*, 2009; Callahan *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 1998; Cory, 2002).

Los resultados anteriores son relevantes desde el punto en que los genotipos de *Sechium* spp., amargos no comestibles tienen ahora un uso conocido, lo cual abre posibilidades de uso sostenible que evite su pérdida y favorezcan su conservación como recursos genéticos para la alimentación y la agricultura (RGAA), y considera la posibilidad de que a través del incremento de la caracterización morfoquímica su uso sea sostenible. Otra ventaja posible de lo anterior es la relación con actores rurales en la implementación de proyectos para diversificar la actividad productiva y económica bajo contrato con industrias.

Aun cuando el estudio tiene rasgos preliminares, los resultados indican buenas expectativas para la potenciación de los RFFA evaluados con distinto uso al alimenticio. Sin embargo, la realización de un mayor número de ensayos es muy prudente, tales como evaluación en ratones y posteriormente en humanos bajo protocolo bioéticos autorizados. Un aspecto relevante es que se cumple con aspectos inscritos en los compromisos internacionales de la gestión ambiental para conservar, aprovechar y transferir a productores rurales organizados enlazados con la industria este conocimiento básico para el diseño de proyectos.

4. Conclusiones

Identificar que los extractos de *Sechium* spp., inducen fragmentación del ADN en células leucémicas pero no en las normales indica que estos tienen selectividad sobre células tumorales, a diferencia del antineoplásico de uso clínico Ara-C®; lo anterior obtiene relevancia pues los medicamentos utilizados para combatir el cáncer son específicamente para causar un daño celular, que no es selectivo para las células tumorales, lo cual afecta a todas las células del organismo, resultando en efectos tóxicos adversos para el paciente,. De ahí la importancia de tener agentes los cuales induzcan apoptosis, requieran de dosis muy pequeñas, y además muestren selectividad, como es el caso de los extractos de *Sechium* spp., utilizados en el presente estudio.

5. Bibliografía

- Aguiñiga-Sánchez, I., Soto-Hernández, M., Cadena-Iñiguez, J., Ruíz-Posadas, L. M., Cadena-Zamudio, J. D., González-Ugarte, A. K., Weiss Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2015). Fruit Extract from *A Sechium edule* Hybrid Induce Apoptosis in Leukaemic Cell Lines but not in Normal Cells. *Nutrition and Cancer* 18:37-22.
- Arango, P.M.C., Llánes, F.L., & Díaz, R.T.M. (1997). La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Revista Cubana de Oncología*. 13: 126-134.
- Bacsó, Z., Richard, B., Eliason, E., & Eliason, J. (2000). The ADN of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. *Cancer Research*. 60:4623-4628.
- Cadena-Iñiguez J., Soto-Hernandez, M., Torres-Salas, A., Aguiñiga-Sánchez, I., & Ruiz-Posadas, L. (2013). The anti-proliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of Medical Plant Research*. 7: 455-446.
- Callahan, M.K., Williamson, P., & Schlegel, R.A. (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Nature*. 7: 645: 653.
- Callus, B. A., & Vaux, D. L. (2007). Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*. 14, 73-78.
- Chaurio, R. A., Janko, C., Muñoz, L.E., Frey, B., Herrman, M., & Gaip, U.S. (2009). Phospholipids: Key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 14: 4892-4914.
- Colin-Valenzuela, A., Gómez-López, N., Ávila-Lombardo, R., & Barroso-Villa, G. (2010). Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas. *Ginecología y Obstetricia de México* 78: 669-676.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2: 647-656.
- Eui-Jeon, W., Yeon-Gil, K., Min-Sung, K., Won-Deok, H., Sejeong, S., Howard, R; Sam-Yong, P., & Byung-Ha, O. (2004). Structural mechanisms for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Molecular Cell* 14:531-539.
- Guimaraes-Iglesias, V., Guiñon-Gil, E., Gabernet, G., Belinchón-García, M., Osuna-Sánchez, M., Casanelles, E., Comella, X.C., & Yuste, V. (2012). Apoptotic ADN Degradation into Oligonucleosomal Fragments, but Not Apoptotic Nuclear Morphology, Relies on a Cytosolic Pool of DFF40/CAD Endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 7766-7779.
- Iglesias-Guimaraes, V., Gil-Guiñon, E., Gabernet, G., Gacía-Belinchon, M., Sánchez-Osuna, M., Casanelles, E., Comella, X. J., & Yuste, J. V. (2012). Apoptotic ADN Degradation into Oligonucleosomal Fragments, but Not Apoptotic Nuclear Morphology, Relies on a Cytosolic Pool of DFF40/CAD Endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 10: 7766-7779.
- Iglesias-Guimaraes, V., Gil-Guiñon, E., Sánchez-Osuna, M., Casanelles, E., Gacía-Belinchon, M., Comella, X. J., & Yuste, J. V. (2013). Chromatin Collapse during Caspase-dependent Apoptotic Cell Death Requires ADN Fragmentation Factor, 40-kDa Subunit/Caspase-activated Deoxyribonuclease-mediated 3'-OH Single-strand ADN Breaks. *The Journal of Biological Chemistry*. 13: 9200-9215.
- Kaufmann, S. H. (1989). Induction of endonucleolytic ADN cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Research* 49: 5870-5878.
- Kerr, JFR., Wyllie, AH., & Currie, A.R. (1972). *British Journal of Cancer* 26: 239-257.
- Kitazumi, I., & Tsukahara, M. (2011). Regulation of ADN fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *The FEBS Journal*. 278: 427-441.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Pientini, M., Nagata, S., & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell. Death Differentiation* 12:1463-1467.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, V., & Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differentiation* 16: 3-11.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., & Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of ADN fragmentation factor induces ADN fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8461-8466.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger ADN fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Morgan, S.J., & Darling, D.C. (1993). *Cultivo de células animales*. Acriba España. pp. 159.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., & Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal ADN during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10: 108-116.
- Rojas, M., Salem, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación de mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa* 4: 92-106.
- Roseto, A., & Brenner, C. (1999). Apoptosis o la muerte celular programada. *Progresos en Medicina Pediátrica* 97:253-275.
- Samejima, K., Ogawa, H., Ageichik, V. A., Peterson, L. K., Kaufmann, H. S., Kanemaki, T. M., & Earnshaw, C. W. (2014). Auxin-induced Rapid Degradation of Inhibitor of Caspase-activated ADNse (ICAD) Induces Apoptotic ADN Fragmentation, Caspase Activation, and Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*. 143: 225-239.
- Samejima, K., Toné, S., Kottke, T. J., Enari, M., Sakahira, H., Cooke, C. A., Durrieu, F., Martins, L. M., Nagata, S., Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (1998). Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *The Journal of Biological Chemistry*. 45: 31617-31623.
- Sánchez-Osuna, M., Gacía-Belinchon, M., Iglesias-Guimaraes, V., Iglesias-Guimaraes, V., Casanelles, E., & Yuste, J.V. (2014). Caspase-activated ADNse Is Necessary and Sufficient for Oligonucleosomal ADN Breakdown, but Not for Chromatin Disassembly during Caspase-dependent Apoptosis of LN-18 Glioblastoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 27: 18752-18769.
- Srinivasula, S., Ahmad, M., MacFarlane, M., Luo, Z., Huang, Z., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. (1998). Generation of Constitutively Active Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of Their Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 10107-10111.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449
- Tang, H.L., Yuen, K.L., Tang, H.M., & Fung, M.C. (2009). Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*. 118 - 122.
- Taylor, R. C., Cullen, S.P., & Martin, S.J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 231-241.
- Walker, P. R., & Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of ADN fragmentation in apoptosis. *Biochemical Cell Biology*. 75: 287-299.
- Widlak, P. (2000). The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochimica Polonica* 47: 1037-1044.
- Widlak, P., Garrard, W.T. (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry* 94: 1078-1087.
- Wyllie, A.H. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *International Review Cytology* 68: 251-306.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., & Dunlop, D. (1984). Chromatin Cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *The Journal Pathology* 142:66-67.

