



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CELULAS HELA  
MEDIANTE EL USO DEL ANTINEOPLASICO CISPLATINO".

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R O F E S I O N I S T A :  
HECTOR GONZALEZ AGUILAR

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

69  
2es



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  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Inducción de Apoptosis en Células HeLa mediante  
el uso del antineoplásico Cisplatino.  
realizado por

González Aguilar Hector

con número de cuenta 8432571-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jorge Meléndez Zagla

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vazquez

Propietario Dr. Jesús Manuel León Cázares

Suplente Dra. Hortensia González Gómez

Suplente M. en C. Laura del B. de Plata

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL

DE BIOLOGIA

C.S.P. M. en C. Alejandro Martínez Mena

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Básica del Instituto Nacional de  
Cancerología, bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajla.**

**"INDUCCION DE APOPTOSIS EN CELULAS HELA MEDIANTE EL USO DEL  
ANTINEOPLASICO CISPLATINO"**

**A mis Padres Irene y Leobardo, cuyo amor y apoyo moral son de un valor inestimable.**

**A mis Hermanos , con cariño y respeto.**

**A mis Amigos y Compañeros de la Facultad de Ciencias.**

**A Jorge Meléndez y Vilma Maldonado, mil gracias por su apoyo y contribución para que este trabajo se haya logrado cristalizar.**

**A todos aquellos que de alguna o de otra manera cooperaron en la realización de esta tesis.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A los sinodales: M. en C. Laura del Bosque y los Drs. Hortensia González, René Cardenas y Manuel León-Cázares por sus opiniones y sugerencias en la revisión del trabajo escrito. Mil gracias.**

**Al Instituto Nacional de Cancerología en donde se realizó la labor práctica y escrita de esta tesis.**

**A la Facultad de Ciencias, especialmente al laboratorio de Biofísica del Control Neuromuscular.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por todo lo que significa para el País.**

**"El universo no sólo es más raro de lo que creemos, sino también más raro de lo que podemos pensar".**

**J. B.S. Haldane.**

**"Sólo una mente plena es clara, y la verdad habita en las profundidades".**

**F. Schiller.**



## ABREVIATURAS

- ARN: ácido ribonucleico.  
ADN: ácido desoxirribonucleico.  
ADP ribosa: difosfato de adenosina unido a ribosa.  
AMPC: monofosfato de adenosina cíclico.  
pH: concentración de iones hidrógeno.  
M: molar.  
mM: milimolar.  
 $\mu$ M: micromolar.  
PBS: Amortiguador salino de fosfatos.  
BSA: Suero bovino con albúmina.  
h: Horas.  
ml: mililitros.  
 $\mu$ l: microlitros.  
mg: miligramos  
Kb: kilobases de ADN.  
IC<sub>50</sub>: índice celular al 50 %.  
nm: nanómetros.  
DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco.  
MTT: bromuro 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio.  
d(pGpG): dos guaninas contiguas.  
d(pApG): adenina y guanina contiguas.  
G1,S,G2 y M: fases del ciclo celular.  
CH1: carcinoma ovárico humano.  
LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante.  
NAD: nicotinamida adenina dinucleotido.  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.  
Caja HMG: grupo de proteínas de alta movilidad.

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>2</b>
<b>Caracterización de la apoptosis y la necrosis</b>	<b>5</b>
<b>Funciones de la apoptosis</b>	<b>13</b>
<b>Cisplatino</b>	<b>17</b>
<b>Cisplatino y apoptosis</b>	<b>20</b>
<b>Células HeLa y apoptosis</b>	<b>22</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>48</b>
<b>APENDICES</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular diferente de la necrosis, que se define como un proceso de autodestrucción celular dirigido genéticamente en cuya manifestación participan numerosos sucesos bioquímicos y moleculares.

En el presente trabajo se utilizó a las células HeLa (una estirpe derivada de un carcinoma humano de cervix uterino) como un modelo para estudiar a la apoptosis.

En este estudio se indujo la muerte en células HeLa mediante la aplicación de diferentes dosis de cisplatino, un antineoplásico muy utilizado en quimioterapia, las cuales fueron del orden de 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$ ; este efecto se reveló en las pruebas de viabilidad celular examinadas mediante espectrofotometría. Para comprobar que este tipo de muerte correspondía a la apoptosis, se procedió a realizar diferentes tipos de tinciones - Feulgen, Bromuro de etidio y Giemsa- en las células HeLa tratadas con cisplatino 40  $\mu\text{M}$ . Se observó que la aplicación del fármaco si produce la muerte celular por apoptosis en dichas células ya que el examen microscópico exhibió las características morfológicas de esta muerte (contracción del núcleo, condensación de la cromatina y reducción del citoplasma).

Por otra parte, se realizaron pruebas electroforéticas con el fin de determinar los tipos de fragmentación que ocurren en la cromatina durante la apoptosis de HeLa. La hipótesis supone que únicamente se producirán los fragmentos de alto peso molecular, basada en reportes previos sobre apoptosis en células HeLa, en donde señalan la ausencia de fragmentos de ADN de bajo peso molecular (escalera).

Se logró encontrar la presencia de los fragmentos de ADN de alto peso molecular con tamaños cercanos a las 23 kilobases a partir de las 9 horas de exposición al fármaco. Sin embargo, también se consiguió detectar a los fragmentos oligonucleosómicos en forma de escalera a las 18 horas, situación no prevista en la hipótesis. La obtención de ambos tipos de fragmentos nos señala la posibilidad de que la degradación apoptótica del ADN, en células HeLa tratadas con cisplatino, se efectúe de modo regular y progresivo.

## INTRODUCCION

### ANTECEDENTES

La muerte es, junto con el crecimiento y la diferenciación, una etapa crucial en el ciclo celular de los organismos. El balance dinámico entre proliferación y muerte da como resultado la homeostasis en las poblaciones celulares.

Recientemente los investigadores se han orientado al estudio de un tipo "natural" de muerte, denominada apoptosis o muerte celular programada. Este fenómeno es de gran relevancia, dado que tiene un papel crítico en varios procesos fisiológicos y patológicos. La función precisa de la apoptosis, la manera cómo se regula y sus mecanismos de acción, son temas de intensa investigación en el campo médico-biológico.

La muerte se puede definir como la pérdida irreversible de la integridad celular causada por severos trastornos fisiológicos y morfológicos (1). La muerte en la célula se presenta bajo las más diversas causas. En 1951 Glücksmann, luego de una serie de estudios embriológicos, estableció que la muerte tiene un papel especial durante la ontogenia normal de los vertebrados (2). Posteriormente en 1966, Sanders también coincide en señalar la importancia de la muerte en los sistemas embrionarios y llega a la conclusión de que este fenómeno es una actividad biológica programada (3).

Hasta hace algunos años, los estudios realizados sobre este tema consideraban que la célula moría de una manera pasiva y accidental por acción de agentes lesivos. A este tipo de muerte celular se le conoce comúnmente como necrosis (Del griego necros: muerte y osis: estado) (2 y 4).

Además de la necrosis, se ha descubierto recientemente otro tipo de muerte celular, denominada apoptosis, conocida también como muerte celular programada, la cual manifiesta una actividad celular característica en donde se necesita la expresión de genes específicos y la presencia de una serie de fenómenos bioquímicos y moleculares. La apoptosis (del griego apo: de y ptosis: desprendimiento) es un proceso activo de autodestrucción celular dirigido genéticamente y que cumple una función homeostática (4 y 5).

Las primeras evidencias de la apoptosis fueron descubiertas por Kerr y colaboradores en 1965. En ese año ellos realizaron estudios histoquímicos en hígados de rata con isquemia y observaron que algunas células muertas presentaban una apariencia morfológica diferente a las células necróticas convencionales (6). Más tarde en 1972, Kerr comparó reportes de varias disciplinas que mencionaban un tipo de muerte celular, semejante a la que obtuvo en sus estudios sobre el hígado, y concluyó que se trataba del mismo fenómeno. Por consiguiente, Kerr propuso llamar apoptosis a este tipo de muerte celular recién descubierta (5).

Tiempo después esta nueva clasificación de la muerte celular dio pauta a numerosas investigaciones y reportes de apoptosis en diferentes tipos celulares y en distintas condiciones, lo que llevó a concluir que la muerte celular programada se manifiesta en la mayoría de los animales pluricelulares (4). Hasta el momento no se ha reportado en organismos unicelulares la presencia de este tipo de muerte.

La muerte celular programada y la apoptosis generalmente se han utilizado como sinónimos. Sin embargo ambos términos no son completamente equivalentes (8). La apoptosis caracteriza un tipo de muerte celular que presenta un conjunto de rasgos morfológicos especiales (8). Por su parte la muerte celular programada es un término de uso general que significa la predeterminación del deceso celular, regulada genéticamente, en las fases embrionarias de un organismo, que puede manifestarse mediante la apoptosis o no (9).

Es decir, la muerte celular programada no indica necesariamente la presencia de la apoptosis en algunos organismos (10). Además la apoptosis puede inducirse con una amplia gama de drogas o estímulos físicos; aquí la muerte es claramente no programada puesto que representa la respuesta celular a cambios en su medio ambiente (8).

La muerte celular programada y la apoptosis se han observado en diferentes organismos animales así como en vegetales (7). En los animales, se han podido detectar durante la metamorfosis de insectos y anfibios y en el desarrollo embrionario de nemátodos y vertebrados.

En el primer caso los insectos mejor estudiados son los lepidópteros *Manduca sexta* y *Antheraea polyphemus* (11) y el díptero *Drosophila melanogaster* (12). Con respecto a los anfibios la apoptosis es un mecanismo eliminador de células que regula la homeostasis de la epidermis del sapo *Bufo bufo* (13); además es posible que la regresión de la cola en la larva de la rana *Xenopus laevis* se deba a un proceso apoptótico pues se ha comprobado que este fenómeno necesita la síntesis de nuevas proteínas (14).

En los nemátodos el caso de la muerte celular programada en *Caenorhabditis elegans*, es relevante ya que su estudio fue el primero en donde se realizaron análisis genéticos y moleculares, que resultaron en el descubrimiento de una batería de genes directamente responsables de la muerte celular. Dos genes se encargan de regular el proceso (Ced-3 y Ced-4); un gen es el inhibidor de los dos anteriores (Ced-9) y una serie de siete genes (Ced 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10) controlan el proceso en el cual las células vecinas se encargan de engullir los restos celulares que al final se producen (11).

En los mamíferos los estudios se han enfocado a varios tejidos como el útero, la próstata, la corteza adrenal, las neuronas, etc, en donde la remoción o adición de un cierto factor de crecimiento hormonal les induce la apoptosis (4). En el sistema inmune de ratones se ha demostrado que los timocitos inmaduros experimentan un rápido recambio que hace que la mayoría de ellos mueran *in situ* debido principalmente a la apoptosis (15).

En los seres humanos algunas evidencias de apoptosis se localizan en tejidos neoplásicos que incluyen a varios tipos de leucemia, en linfomas y en una línea carcinómica de colon (4 y 16).

La apoptosis también se presenta en las enfermedades infecciosas. Existen evidencias que indican que la patogénesis de una gran cantidad de virus incluye la inducción de apoptosis en sus hospederos; como ejemplos están los virus de la anemia de pollo, de la influenza de pavos, el VIH de humanos y muchos otros más (17). A su vez se sabe que las bacterias *Shigella flexneri* y *Bordetella pertussis*, agentes de la disentería y la tosferina respectivamente, eliminan a los macrófagos mediante la apoptosis (18).

En las plantas la muerte celular no necrótica se expresa mediante un mecanismo de autodestrucción celular similar a la apoptosis, si bien son necesarios más estudios que comprueben la existencia de este fenómeno (7).

### CARACTERIZACION DE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS

La necrosis es un proceso patológico que ocurre cuando las células están expuestas a un ambiente dañino. Este tipo de muerte accidental y pasiva se presenta en respuesta a una amplia variedad de condiciones lesivas y sustancias tóxicas, entre las que se incluyen a la hipertermia, hipoxia, isquemia, venenos metabólicos, infecciones y golpes (1 y 4).

Las alteraciones necróticas tempranas se manifiestan con el colapso del núcleo celular (pícnosis) de forma incipiente, acompañado de la condensación de la cromatina. Existe un edema intracelular representado por la hinchazón de orgánulos (retículo endoplásmico, mitocondrias, lisosomas y otras vesículas); se presentan desarreglos en la cara interna de la membrana plasmática, acompañados de un aumento del volumen celular; el nucleólo se disgrega, independientemente del estado de la cromatina (1).

En estados necróticos avanzados la cromatina se degrada completamente de un modo irregular, que se muestra como una masa difusa en el núcleo el cual finalmente se desintegra; la matriz de los organelos se torna amorfa y densa a consecuencia de la acción de enzimas lisosómicas y depósitos de fosfato de calcio. Como punto culminante está la disolución de los orgánulos y la ruptura de la membrana plasmática, la cual permite la salida de los restos celulares hacia el espacio extracelular (1). (Figura 1).

La necrosis regularmente afecta a las células vecinas, debido a la presencia de detritos celulares que junto con la liberación de mediadores químicos desencadenan la respuesta inflamatoria (4).

Los cambios morfológicos se deben principalmente a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática. Estas alteraciones son consecuencia de los desarreglos de las bombas iónicas membranales; ya sea debido al daño físico directo de la estructura membranal, o a la falta de energía celular. Debido a que los cationes se mueven a través de la membrana por gradientes de concentración, los trastornos iónicos causan una considerable hinchazón celular.



El incremento intracelular del calcio citosólico libre ( $Ca^{++}$ ) se refleja en la activación de fosfolipasas que degradan a los fosfolípidos de membrana y causan la desintegración de la bicapa lipídica. La liberación de las hidrolasas de los lisosomas contribuyen significativamente a la rápida desintegración celular.

Hay una baja apreciable de los niveles de proteínas, ARN y ADN. La digestión de las histonas por proteasas, hace que el ADN se desenrolle y en seguida las nucleasas lo rompen en fragmentos irregulares de distintos tamaños (4).

La producción de radicales libres derivados del oxígeno crece apreciablemente debido a la acción de oxidasas y la disminución de la efectividad de los sistemas detoxificantes. Dichos radicales inducen peroxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos membranales y tienen efectos tóxicos en los ácidos nucleicos y proteínas. Los filamentos del citoesqueleto también sufren daños por proteasas activadas, como en el caso de la isquemia del miocardio en donde se presenta una pérdida de vinculina (1).

La morfología de las células en apoptosis se describió detalladamente con la ayuda de la microscopía óptica y electrónica. Este proceso generalmente afecta a células aisladas o pequeños grupos celulares de una manera asincrónica. Los cambios se manifiestan de la siguiente forma:

El citoplasma se contrae y al mismo tiempo la cromatina se condensa en una o varias masas grandes que se adosan a la envoltura nuclear; a continuación el núcleo se fragmenta de tal forma que las fracciones resultantes todavía conservan la envoltura nuclear. La contracción del citoplasma se asocia a la pérdida del iónes y fluido intracelular, que se acrecienta debido a que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que más tarde son expulsadas al exterior (4, 5 y 6).

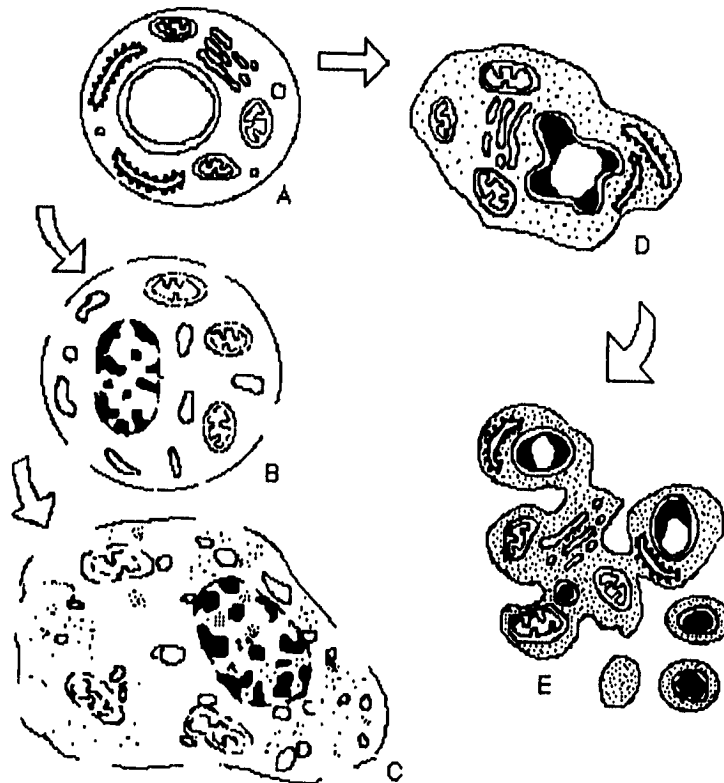
A pesar de esta pérdida de volumen, los orgánulos, a excepción del núcleo, se mantienen intactos y la membrana celular no sufre ningún tipo de ruptura. En vez de esto la membrana pierde su consistencia normal pues se contrae y tiende a formar invaginaciones. Después la célula se rompe en varios fragmentos discretos llamados "cuerpos apoptóticos" que consisten en vesículas con orgánulos intactos junto con porciones de cromatina; todo ello englobado con la misma membrana plasmática de la célula.

Los cuerpos apoptóticos varían en tamaño y su número depende del tamaño de la célula que los originó. Estos cuerpos son rápidamente fagocitados por células vecinas o por el sistema retículoendotelial. Una vez ingeridos, los cuerpos apoptóticos sufren una rápida degradación. En algunos casos éstos no son fagocitados y al degradarse entran en un proceso llamado "necrosis secundaria" (4, 5 y 6) (Figura 1).

Los cuerpos apoptóticos están constituidos por una matriz irregular insoluble formada por proteínas empalmadas por medio de enlaces  $\epsilon$ -(- $\gamma$ -glutamil) lisina catalizados por la enzima transglutaminasa (8). La membrana de los cuerpos apoptóticos evita que los contenidos celulares se expongan al medio extracelular, y de este modo, no se estimula la respuesta inflamatoria (1 y 6).

El fenómeno apoptótico conlleva la manifestación de una multitud de acontecimientos bioquímicos que incluyen la degradación del ADN, la intervención de segundos mensajeros, la activación de enzimas y otros mecanismos.

Un fenómeno distintivo de la apoptosis es la degradación peculiar de la cromatina. Durante este proceso el ADN se degrada progresivamente por la acción de endonucleasas. Los fragmentos producidos tienen determinado tamaño, del orden de 180 a 200 pares de bases o sus múltiplos, a modo de fragmentos oligoméricos debido a que el ADN se rompe en los espacios internucleosómicos (4).



**Figura 1.** Esquema de las diferencias morfológicas entre una célula necrótica y una célula apoptótica. **A:** Célula normal. **B:** Necrosis incipiente. **C:** Necrosis avanzada. **D:** Apoptosis incipiente. **E:** Formación de cuerpos apoptóticos. Tomado de Tomei y Cope. 1991. Apoptosis: The molecular basis of cell death (6).

Los productos de la degradación se pueden detectar por medio de una electroforesis en gel de agarosa que revela un patrón peculiar: un bandeo horizontal regular llamado en escalera o "ladder". Cada una de las bandas expresa el tamaño de los fragmentos oligonucleosómicos. Esta escalera es una de las características de la apoptosis ya que si se realiza una electroforesis a un núcleo necrótico, su corrimiento se muestra como una franja difusa que revela la degradación caótica del ADN (6).

Una explicación a la formación de la escalera apoptótica fue propuesta por Peitsch y colaboradores basados en sus experimentos con timocitos de ratón tratados con dexametasona. Según ellos la producción de fragmentos oligonucleosómicos durante la apoptosis, se debe a que el ADN experimenta primero cortes puntuales en una cadena y después en la complementaria. Dichas rupturas son frecuentes en los segmentos internucleosómicos ocasionadas por la acción de la ADNasa I (19).

Otro tipo de investigaciones puntualizan que, en ciertos casos, la fragmentación oligonucleosómica no es un hecho único en la apoptosis, pues en ellos se ha observado que la integridad del ADN se ve afectada en primer lugar por el corte y liberación de fragmentos de alto peso molecular (bucles cromatínicos) del tamaño de 50 a 300 kilo bases y posteriormente aparecen los fragmentos de 200 pares de bases o no se presentan (20 a 22).

Hasta la fecha, las endonucleasas probablemente responsables de la degradación del ADN son varias, entre las que se encuentran una proteína aniónica de 130 kilodaltones con actividad de ADNasa purificada de núcleos de timocitos tratados con glucocorticoides; la Nuc-18, una ADNasa de 18 KDa aislada del mismo tipo celular anterior; una ADNasa independiente del ión Ca aislada de células CEM-C7; Nuc-1 encontrada en *C. elegans* y las ADNasas I y II. Sin embargo no se ha podido obtener una evidencia directa de su papel en la apoptosis (23).

El papel que juega la fragmentación del ADN en la apoptosis es hasta el momento controvertido, pues aunque se ha sugerido que este mecanismo es probablemente el iniciador de la apoptosis, algunos experimentos han encontrado que la fragmentación del ADN y la activación de endonucleasas son fenómenos tardíos en ciertas células apoptóticas (24, 25). Más aún, un trabajo reportado por Schulze-Osthoff y colaboradores señala la posibilidad de que la activación de la apoptosis sea regulada en el citoplasma, en vez de que se active primero una endonucleasa como acontecimiento primordial (26).

La producción de fragmentos grandes de ADN en ausencia de degradación internucleosómica, sugiere que la condensación de la cromatina puede ser independiente de ésta y posiblemente los tipos de ruptura de ADN pueden variar dependiendo del tipo celular. De hecho aún no se sabe que clase de fragmentación del ADN es el mejor indicador de la apoptosis; al menos se tiene la certeza de que la degradación progresiva de la doble hélice ocurre en todas las células apoptóticas, y se mantiene como un rasgo peculiar de este tipo de muerte (27).

En la actualidad se conocen varias enzimas intracelulares que intervienen en la regulación de la apoptosis. Entre ellas se mencionan a la proteína cinasa C (28 a 32), las tirosinacinasas (33 y 34) y la polimerasa de ADP ribosa (35 a 38). Del mismo modo también existe la injerencia de segundos mensajeros como el Calcio (39 a 43), el AMP cíclico (44 a 49) y la ceramida (28, 50 a 51).

Por otra parte también se ha encontrado que la apoptosis se presenta en condiciones bioquímicas particulares, como el cambio del pH intracelular (52), o en la producción de radicales de oxígeno (53). También es probable que los sucesos oxidativos se presenten en el colapso celular o en las modificaciones estructurales de la cromatina (28).

Existe una buena cantidad de evidencias experimentales que señalan que la inducción de la apoptosis es mediada por la síntesis del ARN y proteínas aunque en ciertos casos, los inhibidores de la síntesis de estas moléculas pueden llegar a inducirla (54). La inducción de la apoptosis a través de la síntesis del ARN y proteínas supuso la existencia de genes responsables del proceso (55). La primera evidencia que demostró la necesidad de genes particulares para la inducción de la muerte celular, provino de la labor de Robert Horvitz y colaboradores quienes utilizaron como modelo al nematodo *C. elegans*; sus resultados mostraron que hay dos genes - Ced 3 y Ced 4 - responsables de la eliminación de 131 células durante la embriogénesis; otro gen hallado - Ced 9 - actúa como regulador negativo del proceso letal; mientras que una serie de siete genes intervienen en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (11).

Otros investigadores han intentado identificar las secuencias génicas importantes en la muerte celular durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* (12) y *M. sexta* (52). Se han descubierto un conjunto de genes que tienen participación en la apoptosis de células de mamífero. Entre estos se incluyen a Bcl-2, (un gene asociado con un linfoma humano) capaz de interferir con el proceso apoptótico (56); al oncogene C-myc que tiene un papel dual pues promueve tanto la proliferación como la muerte celular (57); otros genes que también inducen la apoptosis son: p53, un gene supresor de tumores (4, 58); Nur 77, cuya expresión puede intervenir también en la proliferación y diferenciación celular (59) y Fas/Apo -1, un receptor de superficie de linfocitos activados, cuyo gen es homólogo al del receptor del factor de necrosis tumoral (60).

Por otra parte se encontró que ciertos virus ejercen una regulación genética que impide a la célula infectada entrar en apoptosis, como un mecanismo que permite la multiplicación viral y asegura la infección. Como ejemplos se mencionan a los adenovirus, que infectan células de mamíferos (61), a los baculovirus que infectan insectos (62), y al virus de Epstein-Barr (63).

## FUNCIONES DE LA APOPTOSIS

En la embriogénesis normal.

La apoptosis tiene un papel vital en el desarrollo embrionario de los vertebrados superiores. Interviene en fenómenos como la eliminación de las membranas interdigitales en muchos amniotas, la fusión del paladar, la regresión de los conductos de Müller en los machos, el desarrollo de la mucosa intestinal y la retina, la diferenciación neuronal embrionaria, etc; así como durante la regresión tisular en la metamorfosis de anfibios y en la ontogenia de *C. elegans* (6, 11 y 14). Probablemente muchas de las células que mueren durante el proceso embriológico sean vestigios que en especies ancestrales tuvieron una función activa y más tarde fueran programadas para morir.

En tejidos adultos normales.

La apoptosis, como parte de la regulación homeostática de los tejidos normales, continuamente ocurre en sitios como el hígado o el epitelio de la corteza adrenal, donde existe una baja proliferación de células. También aparece en poblaciones de rápida proliferación como el epitelio de las criptas intestinales y las espermatogonias (6). Otro ejemplo es el endometrio cuyas fases secretora tardía, premenstrual y menstrual presentan muertes masivas de células epiteliales glandulares (4). La apoptosis actúa en la producción de células T durante la eliminación de timocitos inmaduros (15). La regulación coordinada de la proliferación y muerte celular proporciona un control preciso sobre el tamaño tisular. De este modo las células que ya cumplieron su función mueren y dejan que las células jóvenes las reemplacen (11).

#### Regresión de órganos e hiperplasias.

La apoptosis interviene cuando se presenta la atrofia de órganos como la próstata (64), timo (39) o la corteza adrenal (5), causada principalmente por fluctuaciones hormonales. Respecto a las hiperplasias producidas por estímulos mitogénicos, la reversión del tejido a su condición normal se efectúa mediante la apoptosis después de la remoción del estímulo (6).

#### En infecciones y mutaciones.

En los organismos multicelulares la apoptosis ocurre como un modo de eliminar células cuya sobrevivencia puede perjudicar al organismo. En el proceso inmunológico, algunos timocitos pueden llevar receptores capaces de reconocer y atacar a tejidos del propio organismo (autoinmunidad), por esto las especies autoreactivas son inducidas a la apoptosis en el timo. Los neutrófilos también son potencialmente peligrosos en la respuesta inflamatoria; el cuerpo, tan pronto como puede, evita que los neutrófilos dañen a los tejidos sanos al removerlos, mediante apoptosis, del sitio de la infección seguido de un proceso de fagocitosis (4 y 6).

Varios trabajos recientes sugieren que la muerte celular producida por el VIH (virus del SIDA) es mediante la inducción de apoptosis en células infectadas (65). Las infecciones retrovirales atacan directamente al núcleo celular donde causan mutaciones y daños en el ADN.

Por tanto, las células llevan a cabo la apoptosis como un mecanismo de defensa. La eliminación de células infectadas por virus por linfocitos citotóxicos es un ejemplo. La fragmentación del ADN impediría el ensamble de ADN viral y anularía la transferencia de material genético dañado cuando son fagocitados los cuerpos apoptóticos. Cuando algún agente químico o físico produce al ADN un daño no reparable, generalmente se dispara la apoptosis ya que las células potencialmente mutadas constituirían un riesgo para el organismo (6).



#### **Apoptosis espontánea en tumores.**

La apoptosis ocurre de manera frecuente y espontánea en los tumores malignos. Las interacciones célula-célula son importantes para el desarrollo normal, y la pérdida de tales adhesiones se asocian con algunas neoplasias.

Por tanto, la apoptosis serviría como un mecanismo fisiológico de control celular al deshacerse de células aberrantes (16). Probablemente los mecanismos de regulación de la población celular participen en las etapas tempranas de la oncogénesis, al incrementar la apoptosis temporalmente y balancean cualquier aumento de proliferación celular.

Es posible que algunos mecanismos inhibitorios de la apoptosis, como la expresión del protooncogen Bcl-2, podrían participar en el desarrollo de tumores resistentes a los efectos de agentes quimioterapéuticos y contribuir al crecimiento de los tumores y quizás a la oncogénesis, al permitir la sobrevivencia de células con ADN anormal (66).

#### **Posibles usos terapéuticos.**

La importancia de la apoptosis en la medicina reside en que es un fenómeno regulable susceptible a la estimulación e inhibición. El control de la muerte celular programada sería muy útil en el tratamiento de enfermedades en donde se presentan masas celulares ectópicas, es decir, fuera de su lugar de origen como en la endometriosis (4).

Con respecto al cáncer, existen varios ejemplos de la inducción de apoptosis en células neoplásicas cuyos agentes pueden ser glucocorticoides (67), somatostatina y LHRH (68), andrógenos (69) y compuestos anticancerígenos como el cisplatino (71).

La capacidad de poder inducir muerte celular en células cancerosas puede ser un importante instrumento terapéutico. La importancia de la apoptosis en el tratamiento de neoplasias malignas, se ha verificado por los efectos de la interrupción hormonal en tumores dependientes de hormonas (71). El efecto de los glucocorticoides en la leucemia linfocítica aguda, es otro ejemplo del potencial terapéutico de la inducción de la apoptosis en tumores. El desencadenamiento de la muerte celular en células transformadas por el anticuerpo monoclonal Fas/APO-1 es una posible aplicación contra el cáncer (66).

Por otra parte el bloqueo de la apoptosis causado por la sobreexpresión del gen Bcl-2 parece proteger a las células neoplásicas de un gran número de drogas citotóxicas; esto apoya la idea de que la apoptosis es la vía principal utilizada por los anticancerígenos para producir la muerte celular, mediante la interacción de cinasas y fosfatasa.

Sin embargo la acción de la droga puede depender de los efectos indirectos del gene Bcl-2, o de los inhibidores, en la alteración del ciclo celular, en los cambios en el transporte y metabolismo de los fármacos o por la modulación de la capacidad reparadora (71 y 72).

En la respuesta inflamatoria, la remoción de neutrófilos del sitio afectado es efectuada por la apoptosis y la intervención de macrófagos. La eliminación de células, que evita la liberación de los contenidos granulares y del citosol, es necesaria para el cese de la inflamación. La activación de apoptosis en neutrófilos puede permitir la limitación del daño tisular asociado con la respuesta inflamatoria, y posiblemente ser utilizada para el tratamiento de enfermedades crónicas como la artritis reumatoide (4).

## CISPLATINO

Diaminodicloroplatino II. Platinol.

## Descubrimiento y uso terapéutico.

El cisplatino es un complejo metálico inorgánico hallado por Rosenberg y colaboradores en 1965. Su actividad biológica fue descubierta accidentalmente durante experimentos que estudiaban el efecto de la corriente eléctrica en *Escherichia coli*. Se encontró que la división celular de la bacteria se inhibía no por la corriente eléctrica, sino por el cisplatino producido por la reacción de los iones amonio y cloro de la solución con los electrodos de platino (73).

Posteriormente se descubrió que el cisplatino posee una potente actividad antineoplásica especialmente útil en el tratamiento de cánceres epiteliales. Este fármaco se ha constituido en la base para el desarrollo de tratamientos curativos para tumores de cabeza, cuello, testículo, ovario, vejiga, esófago y ciertas células de pulmón. Se han sintetizado otros compuestos que contienen platino y usado en tratamiento clínico como el transplatino y el carboplatino (74). Sus nombres hacen referencia a la posición que guardan los grupos  $\text{NH}_3$  con respecto al platino o a su enlace con un compuesto carbonado como se muestra en la figura 2:

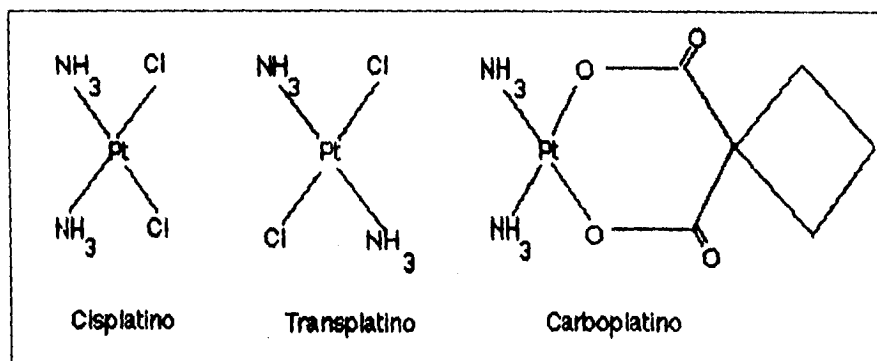


Figura 2. Estructuras químicas del cis, trans y carboplatino.

### Reactividad y toxicidad del cisplatino.

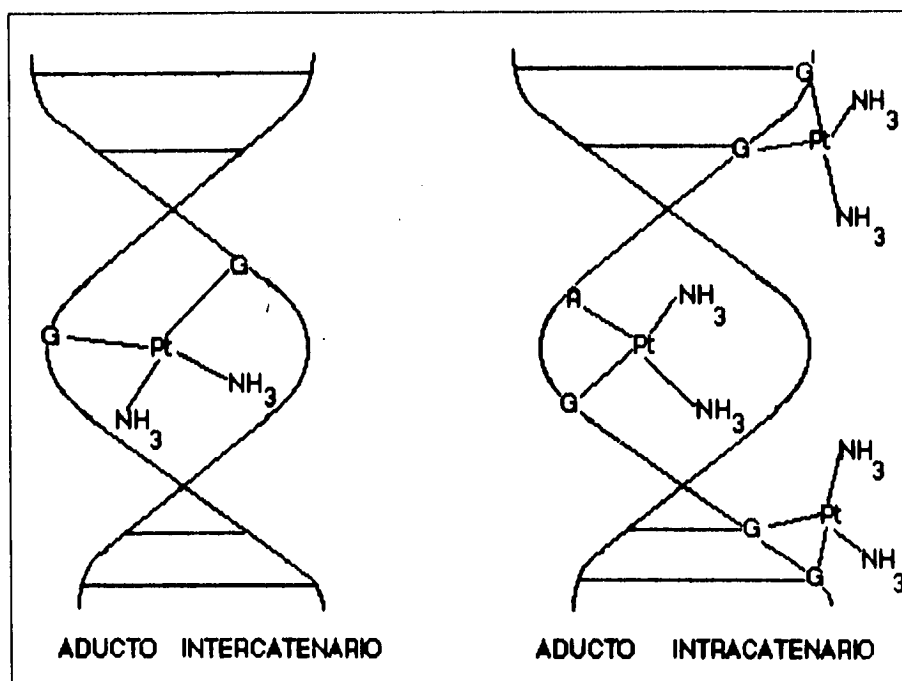
Cuando el cisplatino se disuelve en una solución acuosa, los iones cloro se desplazan y permiten la formación de especies hidratadas, las cuales son las formas reactivas del compuesto (75).

La concentración de los cloruros tienen influencia en la reactividad de cisplatino. Después de la administración intravenosa es relativamente menos reactivo en el espacio extracelular donde la concentración de cloruros es 100 mM, aunque al cruzar la membrana plasmática, su actividad se "enciende" en el citoplasma donde la concentración de cloruros cae a 3 mM. El cisplatino activado es un potente electrófilo (afinidad a cargas negativas) que reacciona con cualquier nucleófilo, como los grupos sulfhidrilos en proteínas y partes nucleofílicas en ácidos nucleicos (75).

La vida media del cisplatino es de 25 a 30 minutos. La concentración declina subsecuentemente con una vida media de 58 a 73 horas. Más del 90% del fármaco en la sangre se une a proteínas plasmáticas. Se encuentran altas concentraciones de cisplatino en riñón, hígado, intestino y testículo, aunque tiene poca presencia en el sistema nervioso central (74).

El daño del cisplatino a la célula se localiza en la interacción del compuesto con el ADN, el cual produce aductos, es decir, el fármaco establece enlaces inter e intracatenarios con la doble hélice a nivel de los pares guanina-guanina y adenina-guanina, aunque también incluye la interacción ADN-proteínas. Algunos estudios cuantitativos muestran que los enlaces 1,2 - intracatenarios d(pGpG) y d(pApG) son el 65 y 25 % respectivamente de los aductos formados *in vitro*.

La difracción de rayos X del complejo cisplatino  $(\text{NH}_3)_2 \text{d}(\text{pGpG})$  revela que las dos guaninas están completamente desapiladas y la deoxirribosa de la 5'-deoxiguanosina está plegada en su extremo C3'. Por estas razones, el aducto intracatenario produce una distorsión severa en la doble hélice, que le provoca desenrollamientos y torsiones locales y en consecuencia promueve la desestabilización estructural de la molécula (76 y77). (Figura 3.)



**Figura 3.** Tipos de aductos formados por el cisplatino. Tomado de Fichtinger-Schepman et al, 1985. *Biochemistry*; 24: 707 a 713. (76).

## CISPLATINO Y APOPTOSIS

Durante varios años se pensó que el efecto citotóxico del cisplatino se debía a que bloqueaba la síntesis del ADN. Varias investigaciones más recientes con células ováricas de hámster chino tratadas con cisplatino, revelaron que la muerte celular no se correlaciona con la inhibición de la síntesis del ADN. Se comprobó que estas células recorrían todo el ciclo celular, se detenían en la fase G2 y morían después de pocos días. En este lapso la síntesis de proteínas y las concentraciones de ATP y NAD permanecieron normales (78).

El análisis de la muerte celular por cisplatino en estas células exhibió la presencia de los rasgos morfológicos típicos de la apoptosis, junto con la detección de la escalera oligonucleosómica; aunado también al hecho de que la apoptosis es inhibida si se tratan dichas células con cicloheximida, un agente bloqueador de la síntesis del ARN y las proteínas (79). Otros estudios con células deficientes en el mecanismo de reparación del ADN indican que la apoptosis se activa por la presencia de aductos del ADN producidos por el cisplatino (80).

Un trabajo realizado por Ormerod y colaboradores (22) indica que el cisplatino induce apoptosis en el carcinoma ovárico humano CH1, con la salvedad de que la degradación del ADN no fue oligonucleosómica sino que se producían fragmentos grandes de 30 kb. Los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que la ruptura del ADN es progresiva y jerárquicamente importante en el inicio de la apoptosis. El efecto apoptótico del cisplatino se ha comprobado en varias líneas celulares. En células leucémicas murinas L1210 una dosis concentrada de la droga les inducía apoptosis, mientras que el tratamiento con dosis bajas les producía un retraso en la fase S seguida de un bloqueo en G2. Las células que superaban dicho bloqueo continuaban el ciclo celular y finalmente morían; no hubo evidencias que sugirieran que las células bloqueadas en G2 sufrieran apoptosis (70).

Sin embargo, Sorenson et al. reportaron muerte por apoptosis en células bloqueadas en G2 después de aplicarles bajas dosis de la droga, lo que contradicen los resultados expuestos anteriormente. La diferencia se puede deber a los distintos medios en los cuales se cultivaron las células; la inducción de apoptosis en este caso puede estar influida por factores de crecimiento. Es posible que en condiciones subóptimas de crecimiento la apoptosis se favorezca (70).

En estudios hechos con timocitos Inmaduros de rata, se reveló que estos fueron resistentes a la inducción de apoptosis por cisplatino; más del 85% de éstos timocitos eran "quiescentes", es decir no se dividían. Con timocitos proliferantes se descubrió que a una concentración de 50  $\mu$ M de cisplatino las células mostraron apoptosis en el 66% de su población. En contraste, el número de timocitos no proliferantes tratados con cisplatino no variaba a los niveles del grupo control. Ambas poblaciones de timocitos sufrían apoptosis por la acción de la metilprednisolona y etoposida, es decir, la muerte en estos casos era independiente del estado de proliferación. Por lo tanto los resultados sugieren que el efecto apoptótico del cisplatino en timocitos depende de que estas células se encuentren en las fases S y G2-M del ciclo celular (81).

Al parecer los cambios en las concentraciones intracelulares del cisplatino o el número de aductos formados no explican la discrepancia que hay en los niveles de apoptosis entre los timocitos quiescentes y proliferantes. La respuesta de los timocitos al cisplatino comparada con la etoposida nos señala que el daño al ADN en sí mismo pudiera ser insuficiente para inducir apoptosis en éstas células y se necesitaría un tipo de trastorno específico aún desconocido (81).

Posiblemente la escasa reparación del aducto intracatenario d(pGpG) contribuya de algún modo a la toxicidad del cisplatino en la célula. También se especula que un tipo de proteínas enlazantes al ADN, como la caja HMG, pueden unirse a los aductos de cisplatino y dificultar su reparación por proteínas específicas, al poder interferir con los sistemas que controlan el paro del ciclo celular después del daño al ADN y consecuentemente disparar la apoptosis.

22

También es posible que el enlace de la caja HMG a los aductos puede aumentar el bloqueo a la duplicación o a la transcripción. De este modo la resistencia celular al cisplatino puede estar determinada por una competencia dinámica entre proteínas que reparan ADN y las que interfieren con la reparación y desencadenan la apoptosis (80 y 83).

### CELULAS HELA Y APOPTOSIS

La línea celular HeLa fue la primera estirpe epiteloide y aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida por cultivo celular seriado. Fue aislada por Gey, Coffman y Kubicek en 1951 proveniente del carcinoma anaplásico de cervix uterino de una mujer de 31 años llamada Henrietta Lack (84). Las células HeLa son un cultivo muy utilizado en numerosos laboratorios del mundo y se le considera una línea celular tipo ampliamente usada en oncología experimental (85). Su relativa facilidad para cultivarse en monocapa en condiciones de laboratorio y su morfología conspicua fueron los aspectos que motivaron la utilización de las células HeLa como un modelo para estudiar la apoptosis.

Los estudios de la apoptosis en células HeLa, en donde se ha inducido este tipo de muerte con la aplicación de otras sustancias distintas al cisplatino, como por ejemplo la ocratoxina, han revelado sus rasgos morfológicos típicos. Sin embargo el análisis electrofóretico del ADN, según estos reportes, señala la ausencia de la fragmentación oligonucleosómica, es decir, de la escalera apoptótica, ya que sólo se ha conseguido detectar la presencia de fragmentos de alto peso molecular (6 y 92). Lo anterior se apoya en un trabajo que señala la falta de la escalera en la apoptosis de células ováricas humanas tratadas con cisplatino (22).

No obstante, existen reportes que mencionan haber detectado la escalera en células murinas L1210 (70) y en células ováricas de hamster tratadas con dicho fármaco (79). Hasta el momento, y según lo que se sabe, no se ha reportado en la literatura científica la presencia de la escalera en la apoptosis de las células HeLa.



### **HIPOTESIS**

La apoptosis puede ocurrir en las células de manera espontánea o por la acción de agentes externos, los cuales incluyen hormonas, radiaciones o fármacos. Por lo tanto si se conoce que el antineoplásico cisplatino induce apoptosis en varios tipos celulares *in vitro*, entonces la administración de este fármaco producirá la muerte en las células HeLa mediante el mecanismo antes mencionado. La apoptosis en estas células será definida a través de aspectos morfológicos. Si se confirma la existencia de la apoptosis en las células HeLa, entonces durante la degradación del ADN, sólo se presentarán los fragmentos de alto peso molecular.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES:**

- Determinar si el cisplatino induce la apoptosis en células HeLa.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Verificar los efectos tóxicos del cisplatino en cultivos de células HeLa.
- Comprobar que el cisplatino elimina a las células HeLa mediante la apoptosis a través de evidencias morfológicas y bioquímicas.
- Conocer los tipos de degradación del ADN que se presentan en células HeLa apoptóticas tratadas con cisplatino.

## MATERIALES Y METODOS

### **Cultivo celular.**

Las células HeLa se sembraron en medio DMEM con suero al 10% y antibióticos (penicilina, estreptomina). Se mantuvieron en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Se trabajaron a una confluencia (número de células) aproximada del 80%.

### **Viabilidad celular.**

Las células se sembraron en cámaras de 24 pozos, se les aplicó Cisplatino a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40 y 80 µM) a diversos tiempos; una serie fue sometida a una prueba colorimétrica de MTT modificada (86). Esta técnica se basa en la capacidad de las células vivas para reducir una sal soluble de tetrazolio de color amarillo, a cristales de formazán color púrpura por medio de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (87). A cada pozo se le agregó 1/10 de volumen de MTT (25 mg/ml) y se dejó incubar mínimamente por 4 horas.

La recolección de los pozos se efectuó conforme los tiempos asignados en el experimento, después de la aplicación del cisplatino. Las células se despegaron de los pozos por raspado, se hizo un lavado con PBS dos veces. A cada muestra se le añadieron 300 µl de la solución HCl-isopropanol 0.04 M y se disolvió el botón, después se agregaron 600 µl de agua destilada y se resuspendió el contenido. Se leyeron al espectrofotómetro a 570 y 650 nm con luz visible y luz ultravioleta, se utilizó como blanco la solución 0.04 M de HCl-isopropanol. Se hizo por triplicado cada experimento. A los porcentajes de sobrevivencia obtenidos se les extrajo la desviación estándar. La prueba colorimétrica utilizada para la viabilidad celular fue examinada previamente en una curva patrón.

**Análisis del ADN.**

Se sembraron células HeLa en cámaras multipozos de 6 lugares. Se les aplicó Cisplatino 40  $\mu$ M y se recolectaron a diferentes tiempos (0,3,6,9,12,15,18 y 24 h.) bajo el procedimiento sugerido por Walker et al (21). Brevemente: para obtener los fragmentos grandes se lisaron las células con la solución B (ver apéndice II). A cada pozo se les agregaron 1  $\mu$ l de bromuro de etidio, 5  $\mu$ l de ARNasa (5 mg/ml) y 5  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) sucesivamente. A continuación todos los pozos se cubrieron cuidadosamente con un tapón de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente se aplicaron 5 voltios a la cámara de electroforesis durante toda la noche para correr el gel. Se visualizó con luz ultravioleta.

Para obtener los fragmentos cortos del ADN las células se recolectaron y se les añadió 100  $\mu$ l de la solución A (Apéndice II). Se lisaron los núcleos con ciclos de congelación. Se les agregaron 5  $\mu$ l de ARNasa (5 mg/ml) y se incubaron a 50 °C durante una hora. Después se incubaron con 5  $\mu$ l de proteinasa K con los mismos parámetros. Inmediatamente se adicionaron 40  $\mu$ l de NaCl 5 M y después 280  $\mu$ l de etanol. Los tubos se agitaron con cuidado y se desechó la medusa de ADN, es decir, los fragmentos de alto peso molecular de ADN. Las soluciones resultantes se congelaron a -40 C por 24 horas.

Posteriormente se centrifugaron a 7000 rpm a 4 °C durante 25 minutos. Al terminar los tubos se decantaron con cuidado dejándolos secar. Se les agregaron 200  $\mu$ l de etanol, se resuspendieron y centrifugaron por dos minutos. Se volvieron a decantar y secar. Se centrifugaron y a cada tubo se le añadieron 20  $\mu$ l de agua destilada, 1  $\mu$ l de bromuro de etidio y 2  $\mu$ l de solución de carga. Se resuspendieron y se vaciaron a los pozos del gel correspondiente. La cámara de electroforesis se sometió a 80 voltios durante dos horas y se extrajo el gel para su observación.

El procedimiento de Walker tiene la ventaja de utilizar el Tritón X-100, un detergente no desnaturizante, que solubiliza únicamente los fragmentos de bajo peso molecular; la precipitación con NaCl y la extracción con etanol permiten aislar adecuadamente los fragmentos chicos de ADN para posteriormente someterlos a electroforesis.

### **Histología de las células HeLa apoptóticas.**

Se sembraron células en cubreobjetos, y se les agregó cisplatino 40  $\mu\text{M}$ , se fijaron con formalina al 10% pH 7.0 durante 10 minutos. Se lavaron con PBS y se guardaron a 4 °C hasta usarse. A la par se procesaron células sin cisplatino como control.

### **Tinción con Feulgen y bromuro de etidio.**

La células fijadas se sumergieron en HCl 5 N por 8 minutos, se lavaron con agua corriente durante 3 minutos y después con agua destilada. Se colocaron en reactivo de Schiff por una hora y se lavaron en agua corriente y agua destilada. A un par de cubreobjetos se les deshidrató progresivamente con soluciones de etanol graduadas (50, 70, 80 y 96%). A continuación se contratiñeron con verde rápido "Fast green" durante tres segundos, se enjuagaron en xileno y se secaron al aire. Finalmente se montaron con resina sintética.

A otro par de cubreobjetos se les embebió en ARNasa preparada, se les incubó durante 10 minutos a 37 °C y se enjuagaron con agua corriente. Después se les aplicó una solución de bromuro de etidio durante 5 minutos. Se enjuagaron con PBS y se montaron en gelatina glicerina.

La tinción de Feulgen es un método para colorear el ADN nuclear, mediante el tratamiento previo con ácido clorhídrico para facilitar la reacción con el ADN, esto es, ocasiona la hidrólisis de las bases púricas quedando expuestos los grupos aldehídicos de la desoxirribosa. En seguida la adición del reactivo de Schiff, permite que al combinarse con los citados grupos aldehídicos, se tñe a la doble hélice de color rojo. (Figura 4). Posteriormente se contratiñe con el reactivo de verde rápido para proteínas básicas el cual colorea al citoplasma (88).

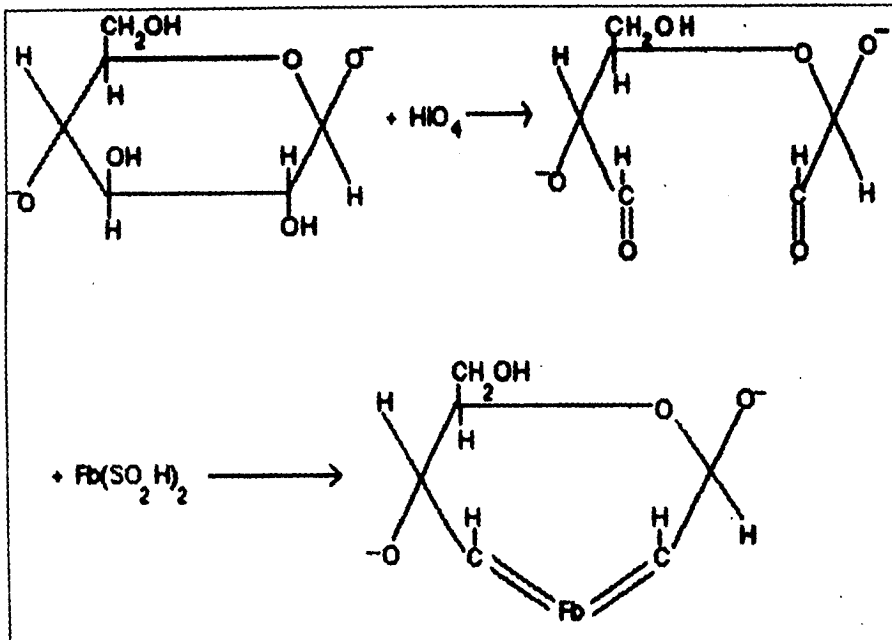


Figura 4. Reacción del ácido peryódico y reactivo de Schiff.  
Fb. fucsina básica.

Por su parte el uso del bromuro de etidio es especialmente adecuado para la detección fluorescente del ADN. La propiedad de este compuesto de intercalarse estrechamente entre dos pares de bases le confiere un incremento veinte veces mayor en su intensidad fluorescente a comparación del bromuro aislado; además dicho intercalamiento es específico para ácidos nucleicos de doble hebra (89).

#### Tinción con Giemsa.

Otros cubreobjetos con células control y con cisplatino (40  $\mu$ M) se fijaron con etanol absoluto a -70 °C por 5 minutos, después se secaron al aire. Los cubreobjetos se sumergieron un minuto en solución concentrada de Giemsa, se lavó el exceso de tinción con PBS y se montaron directamente en el portaobjetos con gotas de PBS y se guardaron a -4 °C para su posterior observación.



La tinción de Giemsa es regularmente usada para colorear a la cromatina. Consiste de una mezcla de varios colorantes que interactúan con los grupos fosfatos del ADN de manera que tiñen uniformemente a los cromosomas; la fracción Eosina del Giemsa únicamente optimiza la coloración (90).

## RESULTADOS

Durante la aplicación de cisplatino a las células HeLa, se observó su morfología al microscopio óptico invertido a 10 y 40x, antes de recolectar los pozos. Conforme transcurrió el tiempo aumentó la cantidad de células muertas por apoptosis, que se evidenciaban por una reducción de volumen celular y una condensación de la cromatina, además de la presencia de cuerpos apoptóticos que flotaban en el medio; todas estas características son típicas de la apoptosis (4 y 5).

Este efecto apoptótico fué proporcional a la concentración de cisplatino administrada. En los pozos control no había presencia de apoptosis y la células continuaban proliferando normalmente. En las concentraciones de 40 y 80  $\mu\text{M}$  después de las 24 horas de aplicación de cisplatino, se observó que la mayor parte de la población celular estaba muerta por apoptosis.

Con el fin de cuantificar el efecto del cisplatino en la viabilidad celular, se utilizó la prueba colorimétrica de MTT de Mosmann modificada (86). Antes de comenzar los experimentos se elaboró una curva patrón de crecimiento de células HeLa control con la prueba de MTT, la cual demuestra que el crecimiento de la población celular es proporcional a los valores de la densidad óptica obtenidos en el espectofotómetro. (Gráfica A).

Durante los primeros tiempos de aplicación (6 y 12 horas) la viabilidad de las células HeLa se mantuvo relativamente alta en todas las concentraciones utilizadas -entre 80 y 90%- ( Gráficas B a F ). En las soluciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de cisplatino las curvas de viabilidad fueron similares: los porcentajes de sobrevivencia disminuyeron progresivamente aunque permanecieron arriba del 70 % hasta las 48 horas después de la aplicación. Tiempo después se manifestó una caída abrupta de la población celular; la viabilidad disminuyó debajo del 40 % cuando se llegó a las 72 horas. Entre estas concentraciones se reflejó una similitud en sus  $\text{IC}_{50}$ , es decir, los tiempos en los cuales las poblaciones celulares disminuyeron en un 50% fueron muy parecidos ( Gráficas B, C y D ) y (Tabla 1).



Por su parte en las concentraciones de 40 y 80  $\mu\text{M}$  las células manifestaron un comportamiento diferente, pues a las 24 horas de aplicación, los porcentajes de sobrevivencia descendieron a niveles inferiores del 40%; tiempo más tarde la población celular continuó disminuyendo y prácticamente murió en su totalidad a las 72 horas. Sus  $\text{IC}_{50}$  se mostraron casi idénticos (Gráficas E y F) y (Tabla 1). La gráfica G es una recopilación de todas las curvas de sobrevivencia obtenidas, e ilustra las semejanzas y divergencias que hubo entre ellas. Estos resultados nos permiten asegurar que el cisplatino es una sustancia letal a las células HeLa que manifiesta su toxicidad dependiente del tiempo y la dosis administrada.

Con base en las curvas de viabilidad se seleccionó la concentración de 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino, ya que esta concentración induce la muerte celular relativamente rápido y se acerca a la concentración utilizada en clínica. Para comprobar que esta muerte celular inducida con cisplatino correspondía a la apoptosis se decidió realizar varias tinciones histológicas

El análisis de la morfología de las HeLa tratadas con 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino por 24 horas se logró mediante el empleo de los colorantes Giemsa y Feulgen, cuyas preparaciones se observaron al microscopio óptico a 40X, y con bromuro de etidio en cuyo caso la observación se realizó en microscopio de fluorescencia a 40X.

Con el uso del Feulgen, contrateñido con verde rápido, las características apoptóticas de las HeLa se evidenciaron claramente: el núcleo se tiñó más intensamente que el citoplasma; se distinguió la contracción del núcleo acompañado con la reducción del citoplasma, también se presentaron algunos cuerpos apoptóticos como pequeños círculos oscuros (Figura 5). Estos resultados se asemejan a la morfología apoptótica reportada por Ormerod, aunque el colorante ahí utilizado fue azul de toluidina y las células fueron de ovario humano (22).

Respecto al bromuro de etidio, se aprovecharon sus propiedades luminosas para visualizar las preparaciones al microscopio de fluorescencia (ver materiales y métodos). De esta manera se observó nítidamente la cromatina condensada teñida de forma intensa, rodeada por un citoplasma contraído y coloreado más tenuemente en un fondo oscuro. (Figura 6). Para contrastar la necrosis y la apoptosis se realizó con esta tinción una preparación de células HeLa necróticas tratadas con hipoclorito de sodio al 2 %

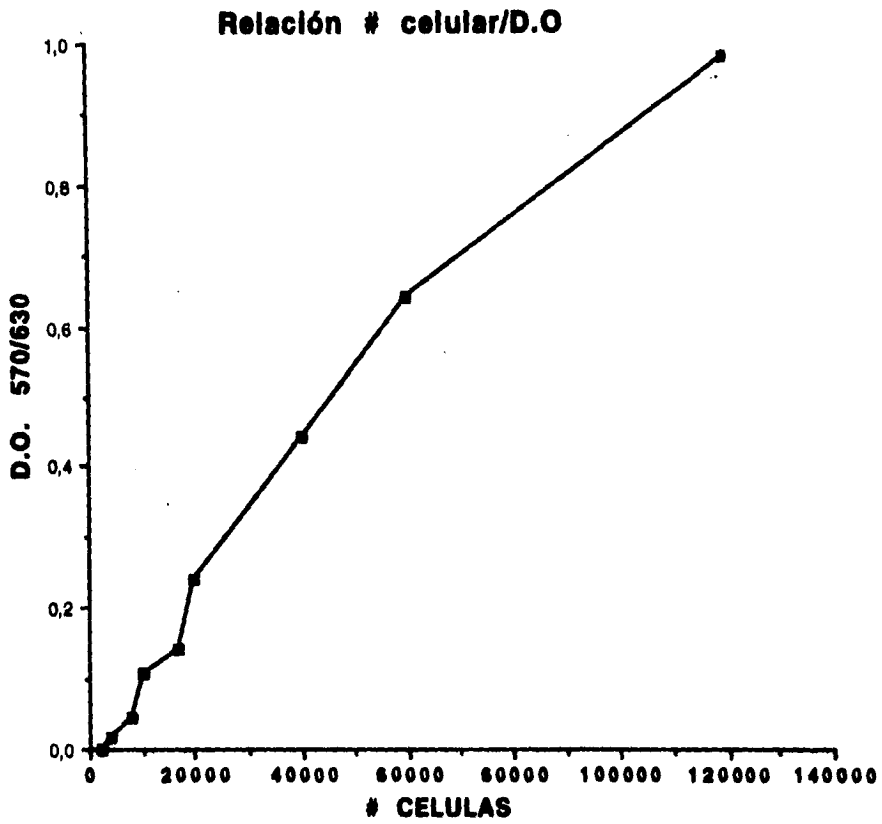
(Figura 7). El uso de colorantes fluorescentes para visualizar la cromatina condensada típica de la apoptosis se ha reportado en varios trabajos, entre los cuales se menciona a la naranja de acridina (82).

Con Giemsa las células HeLa apoptóticas se tiñeron apreciablemente, en especial su núcleo, quien exhibió una cromatina muy condensada; se visualizó también la disminución del citoplasma el cual se coloreó de una manera más tenue. (Figura 8).

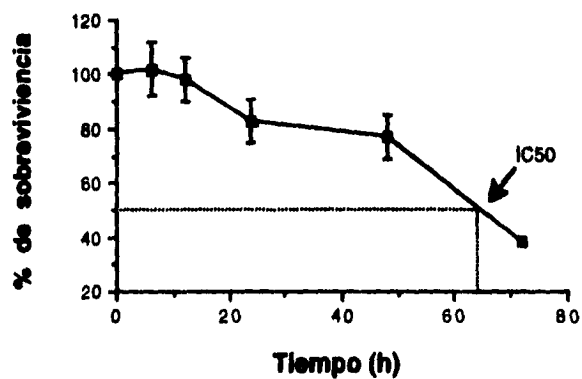
Según los resultados conseguidos en las pruebas de tinción se pudo comprobar que los colorantes utilizados fueron adecuados para resaltar los rasgos apoptóticos de las células HeLa, teniendo cada uno de ellos su grado de sensibilidad propio, puesto que el bromuro de etidio tiñe específicamente ADN (89) y los reactivos de Feulgen y Giemsa son típicos para colorear la cromatina (88 y 90).

Finalmente se realizó un análisis del ADN de las células HeLa tratadas con cisplatino ( $40\mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos. Mediante una electroforesis con gel de agarosa convencional, conforme la técnica de Walker et al (21), se logró detectar fragmentos de ADN de alto peso molecular y de bajo peso molecular en células HeLa tratadas. Los fragmentos grandes del ADN se presentaron a las 9 horas, sus tamaños se aproximan a 23 kb y se asemejan a los fragmentos obtenidos por Walker (21) y Ormerod (22) (Figura 9 B). Los fragmentos chicos se observaron a las 18 horas, mediante la típica escalera, en multímeros de 200 pares de bases aproximadamente, semejante a los reportes de apoptosis con otras líneas celulares y distintos agentes (19, 20 y 21). (Figura 9 A).

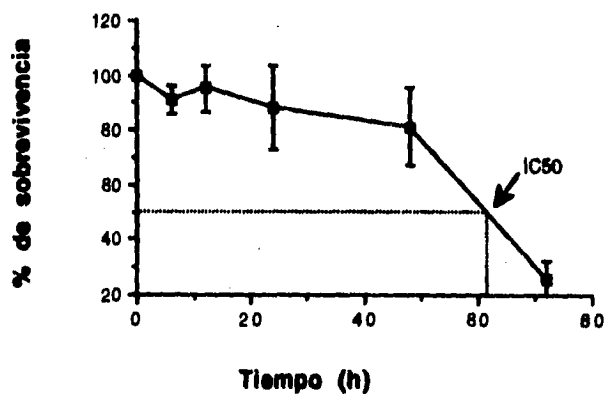
La Figura 10 revela los diferentes patrones electroforéticos entre la necrosis inducida con hipoclorito de sodio al 2 % y la apoptosis inducida por cisplatino con la dosis  $40\mu\text{M}$  en las HeLa. Conforme estos resultados es muy probable que, para las células HeLa, la concentración de  $40\mu\text{M}$  de cisplatino sea la adecuada para la detección confiable de los fragmentos de alto y bajo peso molecular del ADN de acuerdo al procedimiento de Walker.



**Gráfica A. Curva patrón de crecimiento de células HeLa  
obtenida con el método colorimétrico de MTT.**

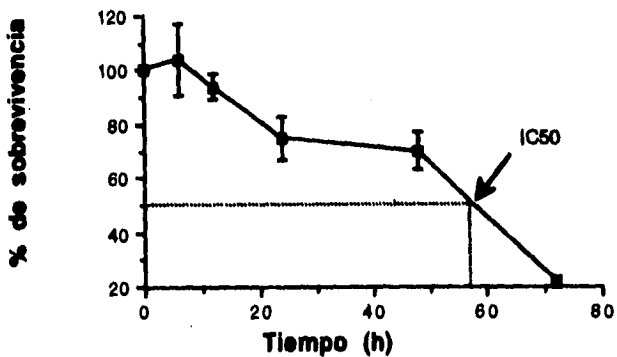


**Gráfica B. Viabilidad de células HeLa con 5 µM de cisplatino.**

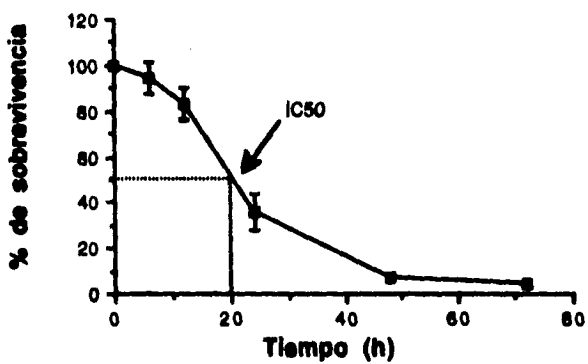


**Gráfica C. Viabilidad de células HeLa con 10 µM de cisplatino.**

Los puntos marcados son representativos de tres ensayos y se obtuvieron mediante desviación estándar.

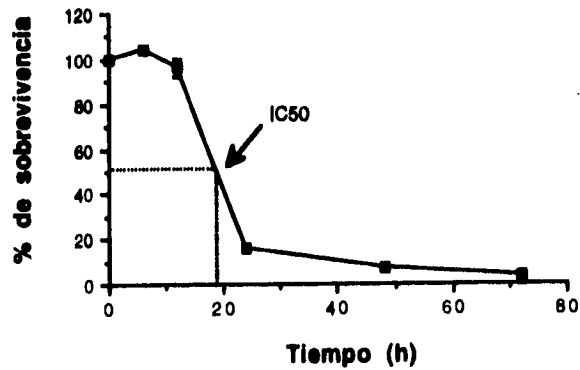


Gráfica D. Viabilidad de células HeLa con 20 µM de cisplatino.



Gráfica E. Viabilidad de células HeLa con 40 µM de cisplatino.

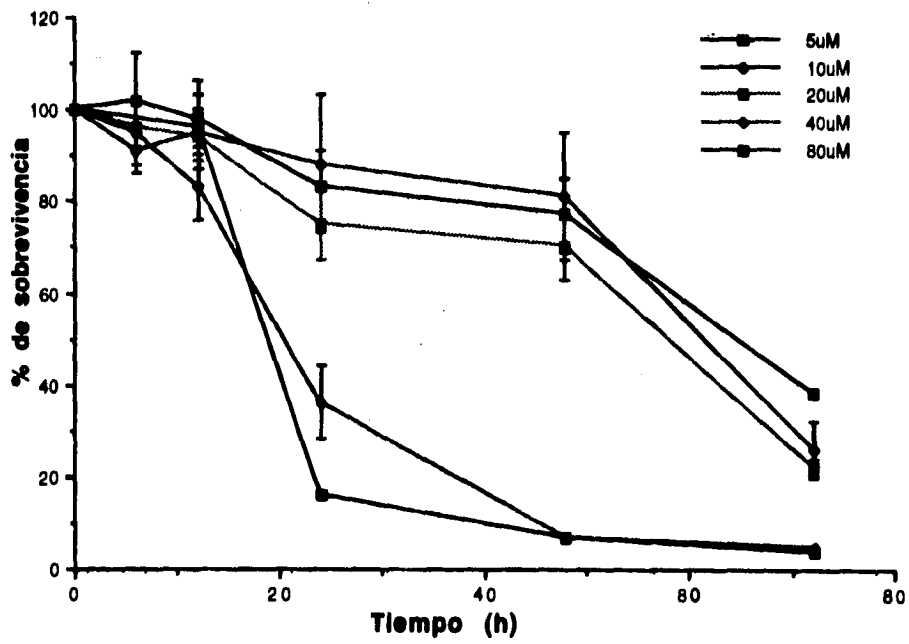
Los puntos marcados son representativos de tres ensayos y se obtuvieron mediante desviación estándar.



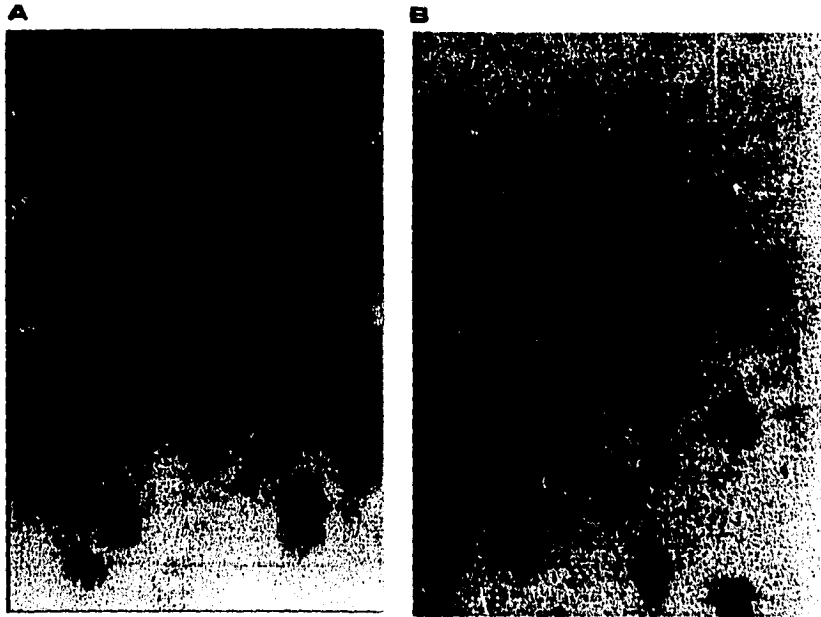
**Gráfica F. Viabilidad de células HeLa con 80  $\mu$ M de cisplatino.**

Cisplatino ( $\mu$ M)	Tiempo (h)
5	64
10	62
20	58
40	21
80	18

**Tabla 1.** Tiempos en que se registraron los IC<sub>50</sub> de las células HeLa con las concentraciones de cisplatino utilizadas. El IC<sub>50</sub> es un índice que expresa el descenso de la población celular en un 50 %.

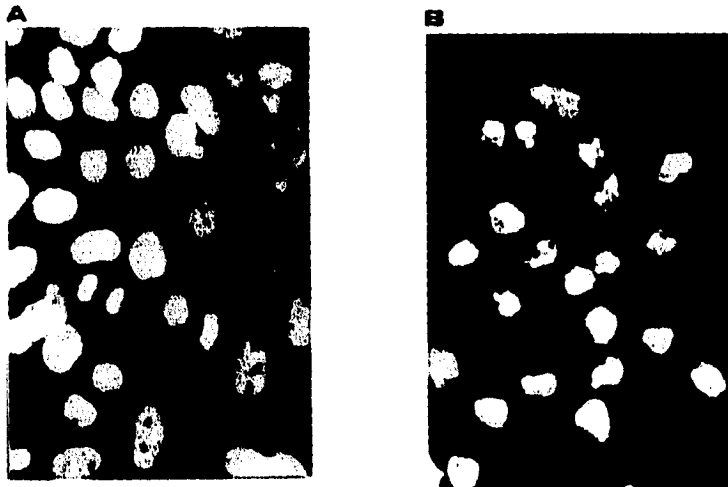


Gráfica G. Comparación de las curvas de sobrevivencia obtenidas de las gráficas B,C, D, E y F.

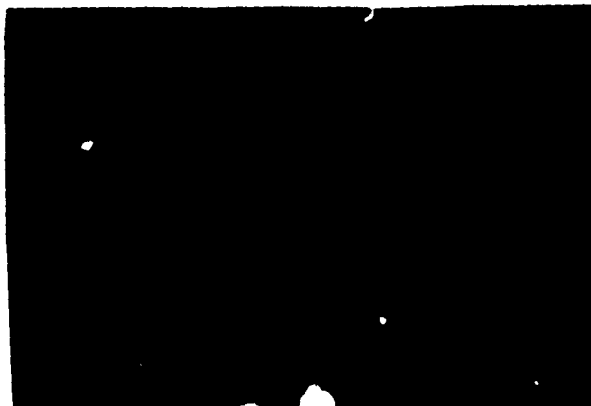


**Figura 5.** Histología de células apoptóticas tratadas con 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino teñidas con la técnica de Feulgen. **A:** células control. Se puede apreciar abajo a la izquierda, una célula en mitosis. 40X. **B:** células apoptóticas. Se puede distinguir el colapso del núcleo (partes oscuras) y la contracción del citoplasma. 40X.

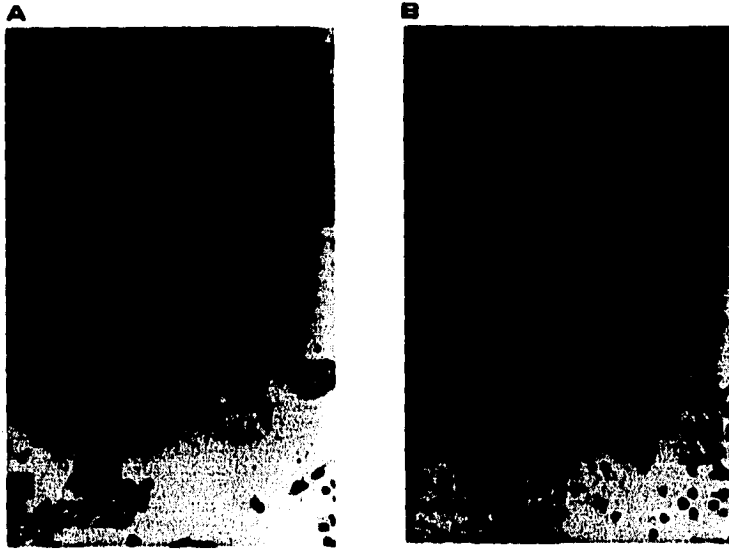




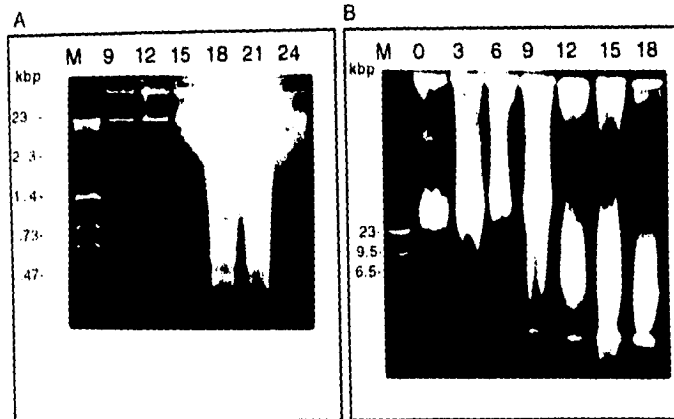
**Figura 6.** Histología de células HeLa apoptóticas tratadas con  $40 \mu\text{M}$  de cisplatino teñidas con bromuro de etidio. **A:** células control. En medio a la izquierda se muestra una célula en mitosis. **B:** células apoptóticas. Se puede distinguir la condensación de la cromatina y la contracción del citoplasma.  $40 \times$ .



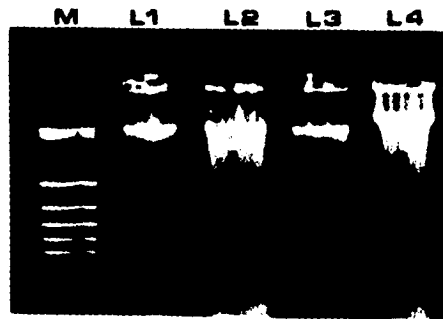
**Figura 7.** Histología de células HeLa necróticas tratadas con hipoclorito de sodio al 2% teñidas con bromuro de etidio. Se puede apreciar la desintegración del núcleo, el aspecto amorfo del citoplasma y el aumento del volumen celular.



**Figura 8.** Histología de células HeLa apoptóticas tratadas con 40  $\mu$ M con cisplatino teñidas con Giemsa. 40 X. **A:** células control con núcleo bien definido. En **B** las células apoptóticas se distinguen por el núcleo condensado y la contracción del citoplasma.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído de células HeLa apoptóticas tratadas con  $40 \mu\text{M}$  de cisplatino. **A:** Fragmentos de bajo peso molecular (escalera). **B:** Fragmentos de alto peso molecular. El carril es el marcador de ADN; las bandas representan los pesos moleculares en kilo bases (Kbp). En **A** la escalera se presenta en el carril de las 18 horas. En **B** los fragmentos se presentan en el carril de las 9 horas.



**Figura 10.** Comparación del ADN extraído de células HeLa apoptóticas y necróticas mediante electroforesis en gel de agarosa. El carril **M** es el marcador de ADN. Los carriles **L1** y **L3** son HeLa control. El carril **L2** muestra HeLa apoptóticas y la presencia de la escalera (con cisplatino  $40 \mu\text{M}$ ). El carril **L4** exhibe HeLa necróticas tratadas con hipoclorito de sodio al 2% y su degradación inespecífica.

## DISCUSION

El cisplatino es un agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de varios cánceres humanos (74). Su mecanismo tóxico aún permanece por explicar, aunque se sugiere que su letalidad se debe a que forma aductos intracatenarios en el ADN (80). Los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad celular nos indicaron que el cisplatino tiene un efecto letal progresivo en las células HeLa conforme transcurre el tiempo de exposición. Esto concuerda con trabajos en donde señalan que el cisplatino tiene un efecto dosis-respuesta en hepatomas (82), en células ováricas de hamster chino (78), humano (22) y en las propias células HeLa (87).

La viabilidad relativamente alta de las HeLa durante los primeros tiempos de aplicación de cisplatino (6 y 12 horas), sin importar el nivel de concentración, se puede deber a que los sistemas detoxificantes de la célula contra el fármaco -glutathion y metalotioneína- neutralizan su acción letal (80 y 87).

Otro motivo puede ser la duración del ciclo celular de las HeLa: se sabe que en estas células la fase G1 dura 8 horas y la fase S 6 horas (91), y aunque el crecimiento de la población muy probablemente fue asincrónico, durante este intervalo de tiempo la toxicidad no se presentó debido a que el fármaco preferentemente provoca la muerte celular después de parar a la población celular en la fase G2 del ciclo, como se ha comprobado en células ováricas de hamster (78) y en células de ratón L1210 (70).

En los tiempos subsecuentes los comportamientos de las curvas variaron según la concentración de la droga. La baja sostenida de la viabilidad en las soluciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , entre las 12 y 48 horas, indica que el cisplatino aún no elimina a la mitad de la población. Es probable que en esos momentos los tioles intracelulares, glutathion y metalotioneína, intervengan para aminorar los efectos del cisplatino (80), sin embargo se ha reportado que su acción no es suficiente para neutralizar completamente la toxicidad de la droga, ya que se piensa que este fenómeno se debe a los mecanismos reparadores del ADN, los cuales eliminarían a los aductos formados.

Lo anterior se apoya en el hecho de que algunas células resistentes al cisplatino muestran un aumento en la actividad reparadora de la doble hebra (80); después de las 48 horas la viabilidad de las HeLa cayó a menos del 50 % en las 72 horas. Este fenómeno posiblemente se explique por el efecto acumulativo del cisplatino y del ciclo celular de las HeLa. Según Volpe y Eremenko (91) la duración del ciclo de estas células abarca aproximadamente 20 horas y si se supone que el crecimiento del cultivo fue asincrónico, se puede sugerir que, en el intervalo de las 12 a las 48 horas, una parte de las células murieron probablemente a que en esos momentos se encontraban en la fase G2; posteriormente la población descendió poco quizás, debido a que en dicho intervalo, las células sobrevivientes entraban en un nuevo ciclo celular.

Después de las 48 horas la mortandad fue masiva debido a que en ese tiempo la mayoría de las células fallecían después de parar en G2, aunque un pequeño porcentaje de la colonia no fue afectada por el farmaco y pudo sobrevivir en los tiempos estudiados.

Comparativamente la toxicidad de las soluciones de 40 y 80  $\mu\text{M}$  fue mucho mayor. Este efecto tan drástico se puede deber a que posiblemente los mecanismos reparadores del ADN sean insuficientes para neutralizar la acción de la droga a estas dosis. Bublely et al reportan que la formación de aductos es directamente proporcional a la concentración de cisplatino aplicado en células prostáticas carcinómicas (93), de este modo se puede suponer que el número de aductos en el ADN pudiera ser crítico para disparar irreversiblemente la muerte celular, ya sea por el daño a la molécula en sí, o por medio de proteínas detectoras de aductos que quizás intervengan en la señal letal (80). Por lo tanto las curvas de viabilidad demostraron el poder tóxico del cisplatino en las células HeLa.

Los experimentos subsiguientes tuvieron el propósito de determinar si la mortalidad de las células HeLa se efectúa mediante la apoptosis. Basados en reportes en donde se señala que el cisplatino induce apoptosis en células ováricas humanas (22) de hamster chino (79), en hepatomas (82), en células murinas (70) y en timocitos proliferativos (80), se consideró la posibilidad de que este fenómeno se pudiera presentar en las HeLa, puesto que existen trabajos que mencionan la inducción de apoptosis en estas células aunque los agentes causales fueron diferentes al cisplatino (6, 92 y 94).

La razón de haber escogido la concentración de 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino para comprobar la apoptosis en células HeLa, se debe a que si bien las dosis de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  pueden producir la escalera oligonucleosómica y los rasgos morfológicos apoptóticos, el tiempo que tardarían en efectuarlo sería mucho mayor a comparación de lo que demoraría la concentración de 40  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 36 horas después), tomando en cuenta sus  $\text{IC}_{50}$  resultantes, con lo que se dificultaría la detección de la escalera. A este respecto según resultados obtenidos por Ormerod (70) en células murinas L1210, dosis menores o iguales a 20  $\mu\text{M}$  de cisplatino no fueron capaces de evidenciar la escalera apoptótica durante la electroforesis.

Con respecto a la concentración de 80  $\mu\text{M}$  aunque su  $\text{IC}_{50}$  es parecido al de 40  $\mu\text{M}$ , su letalidad es mayor en el punto de las 24 horas (Gráfica G y Tabla 1), y si se considera que la escalera apoptótica tiene una duración temporal breve (79), posiblemente en dicha concentración la detección fuera problemática, es decir, no fuera reproducible debido al probable enmascaramiento de la apoptosis por signos de necrosis secundaria.

Una de las características más conspicuas de la apoptosis es la degradación regular del ADN que consiste en la producción de fragmentos de alto y bajo peso molecular, estos últimos revelados durante la formación de la escalera oligonucleosómica (27).

Según los resultados anteriormente presentados, las células HeLa tratadas con 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino experimentaron apoptosis y mostraron los dos tipos de degradación de ADN, es decir, en contradicción con una parte de la hipótesis, no sólo se presentaron fragmentos de alto peso molecular, sino que también hubo fragmentación oligonucleosómica.

Las técnicas utilizadas, basadas en el método de Walker et al (21), se usaron porque permitieron la detección de los dos tipos de fragmentos, particularmente los de alto peso molecular, sin la necesidad de recurrir a la electroforesis de pulsos y en su lugar emplearse la técnica convencional de gel de agarosa; estos procedimientos condujeron a la detección de fragmentos grandes aunque no permitió revelar sus pesos moleculares exactos.

La presencia de los fragmentos oligonucleosómicos en el carril de las 18 horas, nos confirma que la degradación del ADN en escalera es un fenómeno dinámico y de corta duración temporal como se sugiere en el trabajo de Barry et al (79). Posiblemente durante los primeros tiempos de exposición al cisplatino, el ADN que se fragmentó fue insuficiente o inadecuado para revelarse en la electroforesis, y en tiempos posteriores el nivel de degradación es tal que se muestra como un corrimiento irregular. La obtención de los fragmentos de alto peso molecular nos indica que su presencia es constante al menos en la apoptosis de células HeLa, ya sea inducida por el cisplatino o por otras sustancias como la ocratoxina (92), aunque la técnica de Walker no permite determinar el tamaño molecular exacto de tales fragmentos.

Diversos trabajos han reportado únicamente la detección de fragmentos de ADN de alto peso molecular en células HeLa apoptóticas sometidas a sustancias diferentes al cisplatino (6, 92), lo mismo ocurrió en un caso que menciona la inducción de apoptosis por este fármaco en células ováricas humanas (22); mientras que otros investigadores mencionan haber obtenido la escalera mediante la aplicación de cisplatino en células murinas L1210 (70) y con células ováricas de hamster (79). Los motivos que posiblemente no permitieron la detección de la escalera apoptótica en trabajos previos, se pueden deber al uso de una técnica extractiva de ADN de poca sensibilidad, la cual se pudo solventar con el procedimiento de Walker o a que no se encontraron los tiempos críticos en donde se presenta la escalera.

La detección de fragmentos grandes de ADN antes de los fragmentos oligonucleosómicos, nos señala que en las células HeLa tratadas con cisplatino, la degradación del ADN probablemente sea progresiva, es decir, las rupturas en la cromatina primero se realizarían en los niveles más complejos de organización y posteriormente se proceda a cortar la hebra en segmentos oligonucleosómicos.

Coincidentemente la magnitud de los fragmentos grandes de ADN se correlaciona con el tamaño de los bucles de cromatina, lo que confirmaría el corte específico del ADN en esos niveles de enrollamiento. Lo anterior se apoya con algunos casos en donde se muestra el mismo patrón de degradación en otros tipos de células (27), sin embargo, como ya se expuso anteriormente, la fragmentación de alto peso molecular puede no estar acompañada de la escalera apoptótica y viceversa, más aún, se propone que aquellos posiblemente no sean precursores de la citada escalera (27).

48

Esta confrontación de resultados sugiere la probabilidad de que la presencia de alguno, o de los dos tipos de degradación de ADN, dependan del tipo celular o del contexto metabólico en que se encuentren, lo que indicaría la necesidad de determinar cual de las degradaciones es la característica crucial que define con más seguridad a la apoptosis. Conforme a los resultados obtenidos se puede asegurar que la degradación del ADN se presenta de forma específica y gradual durante la apoptosis de las células HeLa tratadas con cisplatino.

En base a todo lo anterior es posible derivar una serie de perspectivas que posiblemente auxilien a complementar los aspectos de la apoptosis en células HeLa: una de ellas sería confirmar o refutar si la apoptosis en dichas células, mediante la acción del cisplatino, acontece realmente en la fase G2 del ciclo celular. Otro sería averiguar la relación que guarda la producción de aductos con el disparo de la apoptosis por cisplatino en células HeLa, es decir, si la presencia de los aductos causa directa o indirectamente esta muerte celular.

Una más sería acerca de la manera en que se degrada el ADN de las células HeLa durante la apoptosis, en otras palabras, dilucidar si en estas células la fragmentación de la cromatina es realmente jerárquica o depende del agente inductor. En sí sería interesante dilucidar que tipos de mecanismos bioquímicos intervienen en la regulación de la apoptosis en células HeLa.



## CONCLUSIONES

El cisplatino es un compuesto tóxico para las células HeLa y sus efectos son del tipo dosis-respuesta.

El cisplatino elimina a las células HeLa mediante el mecanismo de apoptosis sin importar el nivel de concentración utilizado.

La solución de 40  $\mu\text{M}$  de cisplatino demostró ser la más adecuada para detectar confiablemente, mediante electroforesis, la degradación progresiva y regular del ADN, así como para obtener las evidencias morfológicas típicas de la apoptosis en las células HeLa tratadas.

Los resultados indican que la apoptosis en células HeLa, inducida por cisplatino, implica tanto la producción de fragmentos de ADN de alto peso molecular, previamente reportada por diversos autores, así como la presencia de fragmentos oligonucleosómicos (escalera apoptótica); esto último hasta donde se sabe, no ha sido reportado en la literatura científica.

La detección de los fragmentos de alto peso molecular antes de los de bajo peso molecular, nos permite suponer que en la apoptosis de las células HeLa la degradación de la cromatina ocurre de manera jerárquica, aunque serán necesarios estudios más completos que corroboren o rechacen esta aseveración.

## REFERENCIAS

- 1.- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt HE. Apoptosis and Necrosis: basic types and mechanisms of cell death. 1993. Arch. Patol. Lab. Med. 117: 1208-1214.
- 2.- Glücksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. 1951. Biol. Rev. 26, 59.
- 3.- Saunders JW. Death in embryonic systems. 1966. Science. 154, 604.
- 4.- Schwartzman AR, Cidlowski AJ. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. 1993. Endocrine Rev. 14; 2:133-149.
- 5.- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. 1972. Br. J. Cancer. 26: 239-257.
- 6.- Kerr JFR, Harmon BV. 1991. Definition and incidence of apoptosis. An historical perspective. In: Apoptosis: The molecular basis of cell death. Eds Tomei LD. and Cope OF. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- 7.- Greenberg TJ, Guo A, Klessig FD, Ausebel MF. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. 1994. Cell. 77; 4: 551-563.
- 8.- Martin JS, Green RD, Cotter GT. Dicing with death: dissecting the components of apoptosis machinery. 1994. Trends Biochem. Sci. 1: 26-30.
- 9.- Alles M, Alley K, Barret JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelman EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE, Goldgaber D, Green DR, Honn KV, Hully J, Isaacs JT, Kerr JFR, Krammer PH, Lockshin RA, Martin DP, McConkey DJ, Michaelson J, Schulte-Hermann R, Server AC, Szende B, Tomei LD, Tritton TR, Umansky SR, Valerie K, and Warner HR. Apoptosis: general comment. 1991. FASEB J. 5; 8: 2127-2128.
- 10.- Schwartz ML, Smith WS, Jones EEM, Osborne AB. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90; 3: 980-984.
- 11.- Ellis ER, Yuan J, Horvitz RH. Mechanism and functions of cell death. 1991. Annu. Rev. Cell. Biol. 7: 663-698.
- 12.- White K, Grether ME, Abrams JA, Young L, Farrel K, Steller H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. 1994. Science. 264: 667-683.
- 13.- Budz PE, Spies I. Epidermal tissue homeostasis: apoptosis and cell emigration as mechanism of controlled cell deletion in the epidermis of the toad *Bufo bufo*. 1989. Cell Tissue Res. 256: 475-487.

- 14.- Beckingham-Smith K, Tata JR. Cell death. Are new proteins synthesised during hormone-induced tadpole tail regression? 1976. *Exp. Cell. Res.* 100: 129-146.
- 15.- Surh OC, Sprent J. T cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. 1994. *Nature.* 372: 100-103.
- 16.- Bates CR, Buret A, van Helden FD, Horton AM, Burns FG. Apoptosis induced by inhibition of intracellular contact. 1994. *J. Cell Biol.* 125; 2: 403-415.
- 17.- Hinshaw SV, Olsen CW, Dibdahl-Sissiko N, Evans D. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. 1994. *J. Virology.* 68; 6: 3667-3673.
- 18.- Zychlinsky A, Sansonetti PJ. Les bacteries et la mort cellulaire programmée. 1994. *La Recherche.* 25; 264: 444- 445
- 19.- Petsch MC, Muller C, Tschopp J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. 1993. *Nucleic Acids Res.* 18: 4206-4209.
- 20.- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptosis death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 Kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. 1993. *EMBO.* 12; 9: 3679-3684.
- 21.- Walker RP, Kokileva L, Leblanc J, Sikorska M. Detection of initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. 1993. *Biotechniques.* 15: 1032-1040.
- 22.- Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Harrap KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. 1994. *Exp. Cell Res.* 211; 2: 231-237.
- 23.- Peitsch CM, Manherz GH, Tschopp J. The apoptosis endonucleases : cleaning up after cell death? 1994. *Trends Cell Biol.* 4; 2: 37-41.
- 24.- Cohen GM, Sun X-M, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. 1992. *Biochem. J.* 286: 331-334.
- 25.- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Hermann R. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. 1993. *J. Cell. Sci.* 104: 317-326.
- 26.- Schulze-Osthoff K, Walczar H, Dröge W, Krammer HP. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. 1994. *J. Cell Biol.* 127; 1: 15-20.
- 27.- Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. 1995. *Trends Cell Biol.* 5: 21-26.
- 28.- Mc Conkey DJ, Orrenius S. Signal transduction to apoptosis. 1994. *Trends Cell Biol.* 4; 10: 370-375.

- 29.- Kizaki H, Tadakuma T, Odaka C, Muramatsu J, Ishimura Y. Activation of suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters. 1989. *J. Immunol.* 143: 1790-1794.
- 30.- McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Wyllie AH, Orrenius S. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. 1988. *Toxicol. Lett.* 42: 123-130.
- 31.- Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. 1992. *J. Cell. Biol.* 119: 1327-1333
- 32.- Lucas M, Sánchez-Margalet V, Sanz A, Solano F. Protein kinase C activation promotes cell survival in mature lymphocytes prone to apoptosis. 1994. *Biochem. Pharmacol.* 47: 4: 667-672.
- 33.- Evans CA, Owen-Lynch J, Whetton AD, Dive C. et al. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. 1993. *Cancer Res.* 53: 1735-1738.
- 34.- Ukcun FM, Tuel-Ahlgren L, Song CW, Waddick K, Myers D, Kirihara J, Ledbetter JA, Schlieven GL. Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocytes precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9005-9009.
- 35.- De Murcia G, Menissier De Murcia J, Shali S. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. 1994. *Trends Biochem. Sci.* 19: 172-176.
- 36.- Carson DA, Seto S, Wasson DB, Carrera CJ. DNA strand breaks, NAD metabolism, and programmed cell death. 1986. *Exp. Cell. Res.* 164: 273-281.
- 37.- Hayward AR, Herberger M. Nicotinamide protects target cells from cell-mediated cytotoxicity. 1988. *Cell. Immunol.* 113: 414-422.
- 38.- Nosseri C, Coppola S, Ghibelli L. Possible involvement of Poly (ADP ribosil) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. 1994. *Exp. Cell Res.* 212: 367-373.
- 39.- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca concentration. 1989. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 365-370.
- 40.- Waring P. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 14476-14480.
- 41.- McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. 1989. *FASEB J.* 3: 1843-1849.
- 42.- Kluck RM, McDougall CA, Harmon BV, Halliday JW. Calcium chelators induce apoptosis-evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis. 1994. *Biochim. Biophys. Acta.* 1223, 2: 247-354.

- 43.- Whyte MKB. Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. 1993. *J. Clin. Invest.* 92: 446-455.
- 44.- Pratt RM, Martin GR. Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 874-877.
- 45.- Daniel V, Litwack G, Tomkins GM. Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate and the isolation of resistant variants. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 76-79.
- 46.- Duprez E, Gjertzen BT, Bernard O, Lanotte M, Doskeland SO. Antiapoptotic effect of heterozygously expressed mutant R1 (Ala 336-- Asp) subunit of AMPc kinase I in a rat leukemia cell line. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 8332-8340.
- 47.- McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M. Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. 1990. *J Immunol.* 145: 1227-1230.
- 48.- Edwards SN, Buckmaster AE, Tolkosky AM. The death programme in cultured sympathetic neurones can be suppressed at the posttranslational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. 1991. *J Neurochem.* 57: 2140-2143.
- 49.- Lee MR, Liou ML, Yang YF, Lal MZ. cAMP analogs prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas. 1993. *J. Immunol.* 151: 5208-5217.
- 50.- Hannun YA, Bell RM. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. 1989. *Science.* 243: 500-507.
- 51.- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gerwitz DA, Grant S.. Induction of apoptotic DNA damage cell death by activation of sphingomyelin pathway. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 73-77.
- 52.- Barry MA, Eastman A. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca and pH. 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 782-789.
- 53.- Schwartz LM. The role of cell death genes during development. 1991. *Bioessays.* 13: 389-395.
- 54.- Martin SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder? 1993. *Trends Cell Biol.* 3: 141-144.
- 55.- Osborne AB, Schwartz ML. Essential genes that regulate apoptosis. 1994. *Trends Cell Biol.* 4; 11: 394-399.
- 56.- Korsmeyer SJ. Bcl-2 : a repressor of lymphocyte death. 1992. *Immunol. Today.* 13: 285-288.
- 57.- Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP, Green DR. Role for c-Myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. 1992. *Science.* 257: 212-214.

- 58.- Rotter U, Foord O, Navot N. In search of the functions of normal p53 protein. 1993. *Trends Cell Biol.* 3: 46-49.
- 59.- Liu ZG. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur-77*. 1994 *Nature.* 367: 281-284.
- 60.- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S.. The polipeptide encoded by cDNA for Human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. 1991. *Cell.* 66: 233-243.
- 61.- Rao L, DebbasM, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-KDa and Bcl-2 proteins. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7742-7746.
- 62.- Clem RJ, Fehheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. 1991. *Science.* 254. 1388-1390.
- 63.- Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson G. Epstein-Barr virus coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death.1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8479-8483.
- 64.- Martikainen P, Issacs JT. An organ culture system for the study of programmed cell death in the rat ventral prostate. 1990. *Endocrinology.* 127; 3: 1286-1277.
- 65.- Ameisen JC, Estaquier.M. The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. 1995. *Trends Cell Biol.* 5: 27-32.
- 66.- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis : its significance in cancer and the cancer therapy. 1994. *Cancer.* 73; 7: 2013-2026.
- 67.- McConkey DJ, Aguilar Santelises.M, Hartzell P, Erksson I, Meldstedt H, Orrenius S, Jondal M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. 1991. *J. Immunol.* 146: 1072-1076.
- 68.- Szende B, Lapis K, Redding TW, Srkalovic G, Schally AV. Growth inhibition of MXT mammary carcinoma by enhancing programmed cell death ( apoptosis) with analogs of LH-RH and somatostatin. 1989. *Breast Cancer Res. Treat.* 14: 307-314.
- 69.- Kiprianou N, English HF, Issacs JT. Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. 1990. *Cancer Res.* 50: 3748-3753.
- 70.- Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. 1994. *Br. J. Cancer.* 69; 1: 93-100
- 71.- Smets LA. Programmed cell death (Apoptosis) and response to anticancer drugs.1994. *Anticancer Drugs.* 5; 1: 3-9.
- 72.- Hasbold J, Klaus GGB. Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. 1990. *Eur. J. Immunol.* 20: 1685-1690.

- 73.- Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. 1965. *Nature*. 205:698-699.
- 74.- Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1993. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8a. edición. Editorial Medica Panamericana. México. pp. 1209-1210.
- 75.- Lippard S. Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs. 1987. *Pure and Appl. Chem*. 59: 731-742.
- 76.- Fichtinger- Schepman. AMJ, Van der Veer LJ, den Hartog HJJ, Lohman MPH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diaminedichloro platinum (II) with DNA : Formation, identification and quantation. 1985. *Biochemistry*. 24: 707-713.
- 77.- Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diaminedichloro platinum. 1991. *Biochemistry*. 30: 8026-8035..
- 78.- Sorenson CM, Eastman A. Influence of cisdiaminedichloro platinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. 1988. *Cancer Res*. 48: 6703-6707.
- 79.- Barry AM, Benhke AC, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hipertermia. 1990; *Biochem. Pharmacol*. 40: 2353-2362.
- 80.- Chu G. Cellular responses to cisplatin: The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. 1994. *J. Biol. Chem*. 269; 2: 787-790.
- 81.- Evans DL, Tilby M, Dive C. Differential sensitivity to the induction of apoptosis by cisplatin in proliferating and quiescent immature rat thymocytes is independent of the levels of drug accumulation and DNA formation. 1994. *Cancer Res*. 56; 4: 1596-1603.
- 82.- Evans DL, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferation hepatoma cells and non proliferating immature thymocytes. 1993. *Cancer Res*. 53; 9: 2133-2139.
- 83.- Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, Essigmann JM. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. 1990. *Biochemistry*. 29: 5872-5880.
- 84.- Hay Robert. (Edit). 1985. Catalogue of cell lines and hibridomas. 5a. edición. American Type Culture Collection. USA.
- 85.- Segen JC. 1992. The Dictionary of Modern Medicine. The Partenon Publishing Group USA.
- 86.- Tada H, Shino O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukina. 1986. *J. of Immunological Methods*. 93: 157-165.

- 87.- Osmak M, Eljuga D. The characterization of two human cervical carcinoma HeLa sublines resistant to cisplatin. 1993. *Res. Exp. Med.* 193: 389-396.
- 88.- Chayen J, Bitensky L. 1991. *Practical Histochemistry*. 2da. edición. John Wiley & Sons. USA. p.p. 83, 83-85.
- 89.- Le Pecq JB. Etidium bromide: A fluorescent probe of nucleic acid structure and its potential for *in vivo* studies. In: *Fluorescence techniques in Cell Biology*. Eds. Thier TT and Sernetz M. 1973. Springer Verlag. Germany. p.p. 301-309.
- 90.- Wagner R.P, Maguire MP, Stallings RL. 1993. *Chromosomes: a synthesis*. Wiley-Lyss. USA. p.p. 71-72.
- 91.- Volpe P, Eremenko T. A method for measuring cell cycle phases in suspension cultures. In: *Methods in Cell Biology*. Eds. Prescott DM. 1973. Vol VI. Academic Press. USA. p.p. 113-125.
- 92.- Seegers JC, Böhmer LH, Kruger MC, Lottering ML, de Kock M. 1994. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129: 1-11. **A comparative study of ochratoxin A-induced Apoptosis in hamster kidney and HeLa cells.**
- 93.- Bublej GJ, Teicher BA, Ogata GK, Sandoval LS, Kusumoto T. Differences in *in vivo* and *in vitro* sequence-specific sites of cisplatin-DNA adduct formation and detection of dose-responserelationship. 1994. *Biochem. Pharmacol.* 48: 145-153.
- 94.- Meléndez Z.J. y Maldonado L.V. Comunicación personal.



**APENDICE I**

**Viabilidad celular.**

**Material biológico**

**Células cancerosas de cervix uterino. (Células HeLa).**

**Instrumental**

<b>Campana de flujo laminar</b>	<b>Refrigerador</b>
<b>Autoclave</b>	<b>Congeladora</b>
<b>Microscopio óptico invertido Olympus mod. C 2</b>	<b>Hemocitómetro</b>
<b>Espectrofotómetro Beckman mod. DU650.</b>	
<b>Microfuga E Beckman.</b>	
<b>Centrífuga Hettich mod. EBA 35.</b>	
<b>Incubadora Fisher Scientific.</b>	

**Material esterilizado.**

<b>Pipetas serológicas de 2 y 25 ml.</b>	<b>Cajas multipozos de plástico</b>
<b>Pipetas Pasteur</b>	<b>Tubos de ensayo de 15 ml.</b>
<b>Micropipetas y puntas aplicadoras</b>	<b>Microtubos</b>
<b>Frascos de cultivo Falcon.</b>	<b>Pisetas</b>

**Reactivos.**

**Medio de cultivo DMEM con 10% de suero bovino fetal, antibióticos y fenol. (Medio 1).**  
**PBS (Amortiguador salino de fosfatos).**  
**BSA (Suero bovino con albúmina).**  
**Tripsina.**  
**EDTA.**  
**Agua destilada y desionizada.**

**Soluciones.**

Solución de cisplatino 1 mM.

Solución de MTT 0.5 mg/ml.

Solución de HCl en Isopropanol 0.04M.

Solución para tripsinizar I (PBS - 10 ml. EDTA. Tripsina 50 µl).

Solución para tripsinizar II (PBS - 4 ml. BSA).

Azúl tripán 0.05 %.

**APENDICE II****Análisis de ADN****Electroforesis.****Instrumental.**

Probeta de 200 ml.

Parafilm

Balanza de precisión.

Matraz Erlenmeyer de 500 ml.

Horno de microondas.

Ultracentrífuga.

Cámara de electroforesis con peine

Microfuga

Tubos de centrifuga

Fuente de poder con electrodos

Autoclave

Transiluminador.

**Reactivos**

Agarosa

Buffer Tris de Boratos EDTA (TBE) 0.5 X

Agua destilada.

Bromuro de etidio

### Preparación del amortiguador de TBE.

Para un litro de solución stock 5 X :

Se pesó 54 g. de Tris base y 27.5 g. de ácido bórico y se preparó 20 ml de solución EDTA 0.5 M con pH 8.0. Todo se agregó a un vaso de precipitado de 1 litro, se aforó con agua destilada y se disolvió con un agitador magnético. La solución se esterilizó y se guardó en un frasco ámbar. Para obtener TBE 0.5 x, se agregaron 20 ml de TBE 5 x a una probeta de 200 ml la cual se aforó y resuspendió con agua destilada.

### Elaboración y corrimiento del gel.

Se pesaron 0.8 gramos de agarosa y se disolvió completamente en 100 ml de amortiguador. Esta solución se vertió en la cámara de electroforesis de manera que se obtuviera una capa de gel de 1 cm de espesor. Al gelificarse la solución se extrajo el peine y se tuvo listo el gel con sus pozos moldeados.

Se añadió suficiente amortiguador a la cámara con el gel ya montado de tal forma que apenas rebasara el nivel de los pozos. Se vertieron cuidadosamente las muestras en los pozos respectivos. Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se encendió; se ajustaron voltaje, amperaje y potencia eléctrica, aplicándose el tiempo necesario.

Transcurrido el tiempo, se apagó la fuente, se extrajo el gel y se observaron los carriles al transiluminador de luz ultravioleta.

### Reactivos para la obtención de los fragmentos de ADN

Solución A	Solución B
Tris 10 mM pH 7.5 ----- 50 $\mu$ l	SDS al 2% ----- 800 $\mu$ l
EDTA 1mM -----20 $\mu$ l	EDTA 1mM ----- 20 $\mu$ l
Tritón ----- 20 $\mu$ l	Aforar en 10 ml de agua
Aforar en 10 ml de agua destilada.	destilada.

55

RNasa ----- 50 µg/ml

Proteínasa K ----- 500 µg/ml

Etanol absoluto.

Solución de NaCl 2.5 M pH 5.2

Marcador preparado

2 µl de marcador

8 µl de Tris-EDTA (TE).

#### Marcador de peso molecular

Lambda/Hind III, pUC19/Taq\_pUC19/Sau3A1

Es una mezcla compuesta de ADN de lambda digerido con Hind III y ADN de pUC19 digerido por separado con Taq 1 y Sau 3A1. El marcador consiste de 27 fragmentos de ADN lineal de doble hebra separables por tamaño desde 8 pb a 23 kpb.

Concentración del marcador : 500 µg /ml en Tris-HCl 10mM pH 7.5 y EDTA 1mM

### APENDICE III

#### Histología de células HeLa apoptóticas.

##### Instrumental.

Autoclave

Portaobjetos y cubreobjetos

Guantes y gasa estériles

Papel aluminio

cinta adhesiva

Cajas de Petri

Tubos Eppendorf

Incubadora

Microscopio óptico invertido

Campana de flujo laminar

Glicerina y palillos de madera estériles.

Cajas de cultivo de 75 ml

Pipetas serológicas de 10 y 5 ml

Micropipetas y puntas

aplicadoras

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

59

#### Reactivos

Etanol absoluto	Solución de HCl 5 N
Cisplatino 1mM	Agua destilada
Medio de cultivo I	Reactivo de Schiff
PBS 1X	Solución de Fast Green
Formalina al 10 %.	Xileno
Bromuro de etidio	Etanoles al 50, 70, 80 y 96 %

RNasa preparada (1.5  $\mu$ l de RNasa con 1.5 ml de PBS).  
Gelatina glicerinada.  
Soluciones de Eosina y Giemsa concentradas.  
Solución de bromuro de etidio ( 100  $\mu$ l de bromuro de etidio con 900  $\mu$ l de PBS).

#### Preparación de reactivos.

##### Formalina al 10 %-----

Se vertieron 25 ml de formaldehído en una probeta de 250 ml, se aforó con PBS 1x y se agitó la solución.

##### PBS al 1 x-----

Se vertió 5 ml de PBS 10 x a una probeta de 500 ml, se aforó con agua destilada y se agitó la mezcla.