

31  
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
DE QUÍMICAS CUAUTITLAN  
CUAUTITLAN



Departamento de  
Estudios Profesionales

*Registro de Disciplina*

"PERSPECTIVAS DEL EMPLEO DE LA APOPTOSIS  
COMO POSIBLE TERAPIA PARA EL CÁNCER".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SERGIO / HERNÁNDEZ GARCÍA

ASESORES:

M. EN C. FRANCISCO LÓPEZ MEJÍA  
FES-CUAUTITLAN

DR. SAÚL VILLA TREVIÑO  
CINVESTAV-IPN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉX.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

262730



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIO



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Perspectivas del empleo de la Apoptosis como posible terapia para el  
cáncer"

que presenta el pasante: Sergio Hernández García

con número de cuenta: 8609122-8 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de marzo de 1998

PRESIDENTE

M. en C. Luisa Martínez Aguilar

*L. M. A.* 28/11/97

VOCAL

Q.F.B. Eugenia R. Posada Galarza

*E. R. P. G.* 9/10/97

SECRETARIO

Dr. Francisco López Mejía

*F. L. M.* 9-X-97

PRIMER SUPLENTE

Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

*E. R. M.* 5/11/97

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz

*M. P. Z.* 28-11-97

**DEDICATORIA.**

**CON CARIÑO Y ALEGRÍA DEDICO ESTE TRABAJO**

**A DON RAFA Y COPETINA, MIS APÁS.  
A DARDO, KYWZO, LA CONEJA Y TITA, MIS HERMANITOS.**

**A MINERVA, MI VIDA.**

**A TODOS USTEDES LES DEBO LO QUE SOY.**

**A MI NUEVA FAMILIA.**

**A MIS AMIGOS  
Y AL CÍRCULO CERRADO.**

**AGRADECIMIENTOS.**

**A NUESTRA UNIVERSIDAD.  
ESPIRITU DE NUESTRA RAZA.**

**AL DR. SAÚL VILLA TREVIÑO.  
MENTOR.**

**A SAMMY, EVE, OSCAR  
Y COMPAÑEROS DEL LAB. 50,  
DEL DEPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL I.P.N..  
POR SU APOYO.**

## ÍNDICE.

**ABREVIATURAS.**

**TABLAS Y FIGURAS.**

**INTRODUCCIÓN.**

1

**1. APOPTOSIS.**

3

1.1 LA MORFOLOGÍA DE LA APOPTOSIS.

4

1.2 PROCESO DE LA MUERTE CELULAR VÍA APOPTOSIS.

6

1.2.1 EL CICLO CELULAR.

7

1.2.2 LA APOPTOSIS Y EL CICLO CELULAR.

11

1.2.3 MÉTODOS DE ESTUDIO

17

**2. CÁNCER**

19

2.1 EL CÁNCER.

19

2.2 ¿CÓMO SE DESARROLLA UN CÁNCER?

19

**3. APOPTOSIS Y CÁNCER.**

24

3.1 LA APOPTOSIS COMO TERAPIA PARA EL CÁNCER.

26

**4. CONCLUSIONES.**

40

**GLOSARIO.**

44

**BIBLIOGRAFÍA.**

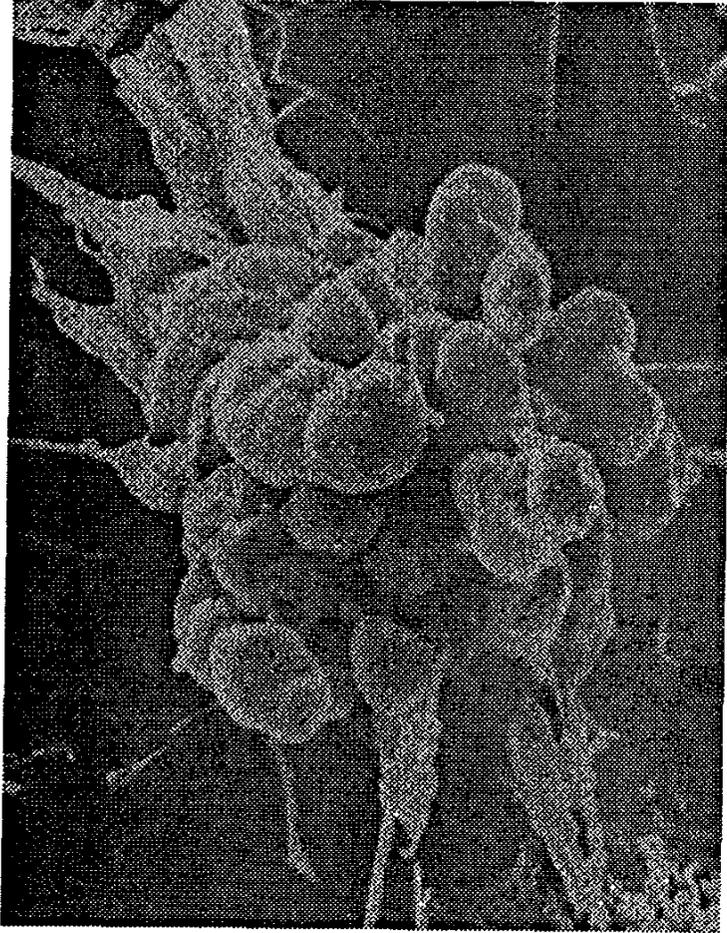
45

## TABLAS Y FIGURAS.

TABLA N° 1 INDUCTORES E INHIBIDORES DE LA APOPTOSIS	12
TABLA N° 2 INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES	27
FIGURA N° 1 LA APOPTOSIS EN EL CICLO CELULAR	9
FIGURA N° 2 PUNTOS CRÍTICOS DEL CICLO CELULAR	10
FIGURA N° 3 FASES DEL PROCESO DE DE LA MUERTE CELULAR VÍA APOPTOSIS	13
FIGURA N° 4 VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL MECANISMO DE LA APOPTOSIS	14
FIGURA N° 5 EQUILIBRIO HIPOTÉTICO DEL PAR BAX-Bcl-2	17

## ABREVIATURAS.

Ad5CMV-p53	Vector adenoviral recombinante que contiene la forma nativa de p53.
ATRA	Ácidos trans retinóicos
AZC	5'-azacitidina.
CAPE	Ácido caféico fenil éster.
CCNPP	Células cancerosas no pequeñas de pulmón.
cdk	Cinasas dependientes de ciclinas.
CECC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
ISEL	<i>In Situ</i> end labeling.
Pb	Pares de bases.
RNA	Ácido ribonucleico.
TGF- $\beta_2$	Factor supresor de las células T
TNF- $\alpha$	Factor $\alpha$ de necrosis tumoral
TNF- $\beta$	Factor $\beta$ de necrosis tumoral
wtp53	p53 en forma nativa.
Y-90-ChL6	Y-90-1,4,7,10-tetraazacyclododecant N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-peptide ChL6



CÉLULA EN PROCESO DE APOPTOSIS.  
(DUKE, 1996)

## INTRODUCCIÓN.

El número de células de un organismo en desarrollo se encuentra en constante incremento, mientras que en un adulto, este permanece invariable aún cuando la división celular continúa, este fenómeno se debe a que la división celular se encuentra en equilibrio dinámico con la muerte celular. Para mantener este equilibrio u homeostasis en el número de células debe existir un mecanismo para su eliminación. La muerte celular ocurre en respuesta a traumas o a condiciones tóxicas, se le conoce con el nombre de necrosis y es, en general, la respuesta al estrés en el medio ambiente (Schwartzman 1993). Evidentemente, la necrosis no forma parte del mecanismo para mantener constante el número de células en un organismo. En la década de los 70's se observó un tipo de muerte celular morfológicamente distinta a la necrosis, la apoptosis, considerada como la contraparte de la mitosis (Majno 1995). Durante algún tiempo se vio como una curiosidad de laboratorio, pero actualmente sabemos que es un mecanismo muy importante, útil en la organogénesis y en la eliminación ordenada de células indeseables, que se dispara al presentarse uno o más estímulos, produce ciertos cambios bioquímicos que se traducen en cambios morfológicos que desencadenan, inevitablemente, la muerte de la célula. Este mecanismo es el responsable de la homeostasis de la mayoría de los tejidos (Schwartzman 1993, Steller 1995).

El cáncer es una enfermedad que ha padecido la humanidad desde hace milenios y actualmente es uno de los problemas más importantes de salud mundial, especialmente en

países desarrollados ya que en ellos una de cada cinco personas morirá por cáncer. Esta enfermedad se caracteriza por un desequilibrio en la proliferación y en la diferenciación de las células (Hartwell 1994), pues se replican en un número mayor a las que mueren, y a menudo dejan de cumplir con las funciones específicas del tejido, además pierden la dependencia a factores de crecimiento, así como al anclaje y la inhibición por contacto, volviéndose una enfermedad invasiva en la etapa final. (Villa en imprenta)

La manipulación de la apoptosis se perfila como una posible terapia para el cáncer bajo la esperanza de poder disparar de alguna manera el proceso de muerte celular activa en las células tumorales sin afectar a las células vecinas sanas, lo cual tendría múltiples beneficios sobre las terapias convencionales para esta enfermedad como la cirugía, la radio y quimioterapia.

La apoptosis ha generado gran interés en varios campos de la investigación incluyendo a la industria farmacéutica, donde el desarrollo de nuevos productos que inhiban o induzcan la apoptosis tiene un enorme valor para el tratamiento de patologías que se encuentran relacionadas con su inducción o supresión. En el presente trabajo se pretende realizar una revisión acerca de la apoptosis como posible terapia para el cáncer, resaltar la importancia de este fenómeno y sugerir algunas líneas de investigación sobre este campo entre la comunidad universitaria.

## 1. APOPTOSIS.

El primer reporte de que las células mueren naturalmente fue elaborado por Carl Vogt, en 1842, durante un estudio de células cartilagosas. Posteriormente, August Weismann lo observa en pupas dípteras en 1864. Se encontraron otros trabajos sobre este tipo de muerte celular, pero no es sino hasta 1885, cuando Flemming hace la primera descripción morfológica clara del fenómeno, durante la regresión de folículos de ovario (Clarke 1995). En 1972, Kerr y colaboradores, compararon este tipo de muerte celular con las observadas en otras disciplinas y concluyeron que en todos los casos se trataba de el mismo proceso. Ellos llamaron a este tipo de muerte celular apoptosis, palabra tomada del griego antiguo empleada para la “caída de” los pétalos de las flores (Kerr 1972).

Muchas células animales, y posiblemente todas, tienen la capacidad de autodestruirse por la activación de un mecanismo intrínseco de eliminación celular, conocido como apoptosis (Steller 1995). Este mecanismo se lleva a cabo de manera ordenada, en una o varias células dispersas (Williams 1992), de forma asincrónica (Schwartzman 1993, Williams 1992), espontánea, no aleatoria, aún no siendo tan longevas para necesitarlo o sin haber sufrido un daño muy severo (Gerschenson 1992, Steller 1995) y ocurre en tejidos diferentes bajo condiciones distintas. Se presenta en organismos multicelulares, participa en eventos básicos como en la organogénesis para la eliminación de células que sólo se requieren por un tiempo limitado, durante la morfogénesis, en la fusión del paladar y en la separación de los dedos durante el desarrollo de las

extremidades (Stewart 1994), en la metamorfosis de insectos y anfibios (Schwartzman 1993), en la diferenciación sexual, en la formación del sistema inmunológico (Williams 1992, Stewart 1994), en la defensa contra células potencialmente peligrosas como los linfocitos auto-reactivos, células infectadas por virus (Steller 1995), en la cicatrización (Desmouliere 1995), entre otros. La apoptosis se ha encontrado en tejidos diferentes, tanto en sanos como neoplásicos, así como en adultos (Gerschenson 1992), y embrionarios (Williams 1992, Fuller 1994, Nagata 1995, Schiffer 1995), y progresa tan rápidamente que es muy difícil de observarse (Schwartzman 1993). La muerte ocurre espontáneamente en muchos casos pero también puede ser inducida por agentes fisiológicos ó nocivos (Lodish 1995).

### 1.1 LA MORFOLOGÍA DE LA APOPTOSIS.

La apoptosis presenta las siguientes características bioquímicas y morfológicas:

1. El proceso se inicia por la interacción de un estímulo externo con algún receptor de membrana o directamente por la producción de un daño en la estructura del DNA (Thompson 1995).
2. Iniciado el proceso de la apoptosis, posiblemente por una señal de  $Ca^{2+}$ , se observa ultraestructuralmente la pérdida de las uniones celulares y otras estructuras de la membrana plasmática especializadas, tales como las microvellocidades (Schwartzman 1993).

3. La célula se arruga por la condensación del volumen citoplasmático aparentemente asociado con la pérdida de iones del citoplasma (Schwartzman 1993, Earnshaw 1995). La cromatina entra en picnosis y se compacta en masas grandes y suaves, que toman formas muy particulares durante este fenómeno, parecidas a medias lunas, herradura, hoz, barco o flecha. La célula adopta una fuerte envoltura transitoria en su contorno que evita que se disperse el contenido celular (Shi 1994, Majno 1995).

4. El núcleo se rompe y la célula se fragmenta en varios puntos de los enlaces de la membrana formando numerosos cuerpos apoptóticos cuyo tamaño esta directamente relacionado con el de la célula. Comunmente son fagocitados por las células cercanas. Este hundimiento de las células forma parte del sistema de fagocitos mononucleares, pero también puede darse normalmente en células epiteliales, endotelio vascular o células tumorales. Los cuerpos apoptóticos son, aparentemente un gran estímulo para la fagocitosis por macrófagos (Schwartzman 1993, Desmouliere 1995, Earnshaw 1995).

5. Hay un nulo o leve hinchamiento de las mitocondrias y otros organelos (Majno 1995).

6. El DNA se fragmenta por la acción de una endonucleasa en segmentos múltiples de 180-200 pb aproximadamente (de 50 a 300 kilobases) (Schwartzman 1993, Martin 1993, Anderson 1994, Majno 1995, Steller 1995). Estos fragmentos muestran, en

una electroforesis en gel de agarosa, un patrón típico, conocido como escalera (Gerschenson 1992).

7. El proceso se encuentra bajo control genético y puede ser iniciado por un reloj interno o por agentes extracelulares, tales como hormonas, citocinas, células asesinas y una gran variedad de agentes químicos, físicos y virales (Majno 1995).

8. La apoptosis es un proceso sumamente rápido (30-120 min.) lo que dificulta su observación en cortes histológicos (Majno 1995). En ocasiones ocurre con un poco de respuesta inflamatoria, y dependiendo del tejido que se estudie, es necesaria o no la síntesis de proteínas o RNA, sin embargo, este evento siempre requiere de energía (Martin 1993, Carson 1993, Fuller 1994).

Es importante señalar que estas características fueron ampliamente documentadas por Kerr y colaboradores en 1972, y desde entonces han sido mínimos los descubrimientos en el aspecto morfológico, no así en el bioquímico.

## 1.2 PROCESO DE LA MUERTE CELULAR VÍA APOPTOSIS.

La apoptosis se lleva a cabo por medio de la activación de un programa de autodestrucción intrínseco de la célula. La maquinaria básica de la apoptosis parece estar presente siempre en todas las células de mamíferos y también se cree, que está estrechamente relacionada con el ciclo celular, pero su activación se puede dar por señales del interior y del exterior de la célula (Rubin 1993).

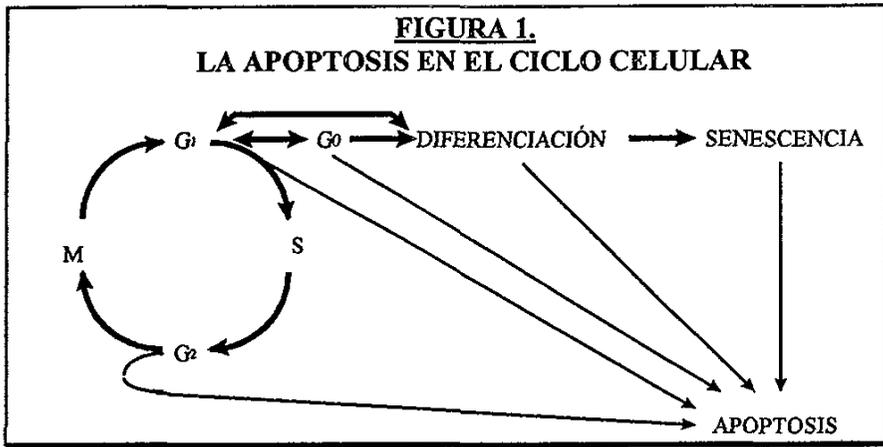
### 1.2.1 EL CICLO CELULAR.

La célula se define como la unidad fundamental, estructural y funcional de los seres vivos. Se reproduce en una sucesión ordenada de eventos que garantizan la duplicación exacta de todos los componentes celulares y su partición en dos células hijas, este fenómeno se conoce como ciclo de división celular (Martin 1993). El ciclo celular tiene diferente duración de un tipo de célula a otra y varía de especie a especie, pero en esencia es universal. En los organismos unicelulares este ciclo da como resultado la formación de un nuevo ser, pero en el caso de los organismos multicelulares es necesario que este ciclo se repita millones de veces para poder formar un nuevo individuo y en un ser humano adulto se repite en millones de células cada segundo para mantener su cuerpo en homeostasis (Duke 1996).

El ciclo celular se divide, para su estudio, en diferentes fases tomando en cuenta los eventos fisicoquímicos que ocurren en la célula, en la mitosis o fase M ocurre el proceso de división nuclear, y al finalizar ésta se obtienen dos células hijas con información genética idéntica (Cordon-Cardo 1995). La mitosis dura en promedio cerca de una hora, es decir, solo una pequeña fracción del tiempo total del ciclo celular. El período que transcurre entre una mitosis y la siguiente se conoce como Interfase, se pensaba que era una etapa de reposo celular, pero hoy sabemos que en ella se desarrolla gran actividad de preparación para la siguiente división celular o para la especialización de la célula hija. La interfase se compone de tres períodos, primero la fase  $G_1$ , la fase S

donde ocurre la replicación del DNA y finalmente la fase  $G_2$ . Una vez terminada la fase  $G_2$  se inicia nuevamente la fase M. Las fases  $G_1$  y  $G_2$  proporcionan a la célula tiempo para duplicar su masa antes de dividirse. Durante la fase  $G_1$  la célula monitorea el ambiente y su propio tamaño y cuando las condiciones son favorables, se inicia el proceso que lleva a la duplicación del DNA. En la fase  $G_2$  la célula se asegura de que la replicación del DNA ha sido terminada correctamente para entrar en mitosis. Las fases  $G_1$ , S,  $G_2$  y M, son las subdivisiones tradicionales del ciclo celular (figura 1), pero no todos los ciclos celulares se rigen por este patrón. Cuando las células se encuentran en  $G_1$  y no están comprometidas a duplicar su DNA, pueden interrumpir su progreso en el ciclo y entrar en un estado de especialización o por el contrario, de reposo, llamado  $G_0$  en el cual puede permanecer por días, semanas o años antes de volver al ciclo de proliferación (Alberts 1994).

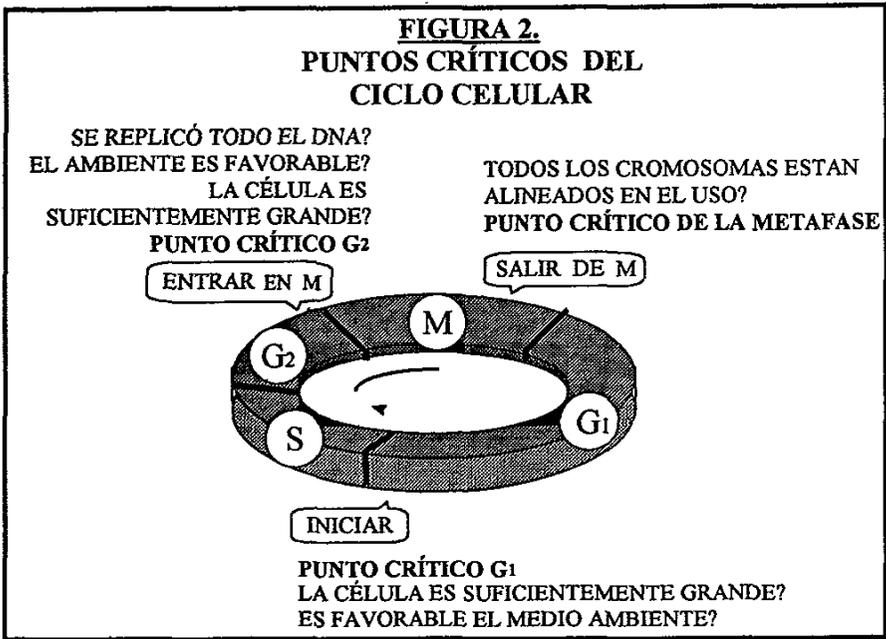
Las investigaciones de muchos científicos se encaminan a la dilucidación del control del ciclo celular, y hoy en día, se sabe que las proteínas que regulan este ciclo, aparecieron hace más de mil millones de años y se han conservado a lo largo de la evolución en todos los seres vivos (Steller 1995).



(Anderson 1994)

El ciclo celular es regulado por un mecanismo bioquímico que opera de manera cíclica. En él intervienen un grupo de proteínas que inducen y coordinan el “proceso en cascada” que duplica y divide el contenido celular. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas. Las ciclinas se unen y activan a las cinasas dependientes de ciclinas o cdk (cyclin-dependent kinases), las cuales fosforilan grupos blanco y de esta manera se activan y regula el ciclo celular durante sus fases. Ellas son los controles mas importantes del ciclo celular, impiden que se dispare la siguiente fase antes de que la anterior finalice, a estos puntos entre dos fases se les conoce como “puntos críticos” (Hartwell 1994). En la figura 2 se puede observar que estos “frenos” también se encuentran regulados por señales del ambiente. Los controles ambientales actúan en el sistema en uno u otro de los dos puntos críticos más importantes en el ciclo, uno en G<sub>1</sub>, justo antes de entrar en la fase S y otro en G<sub>2</sub>, al entrar en mitosis.

En muchas células eucariotes, las señales que detienen el ciclo celular, lo hacen en el punto de control de G<sub>1</sub>. Los eventos externos, tales como la disponibilidad de nutrientes o factores de crecimiento, influyen en los “puntos críticos” pues alteran la disponibilidad de ciclinas y por lo tanto la activación de las cinasas dependientes de ciclinas (Rubin 1993, Martin 1993, Anderson 1994, Levine 1994, Cordon-Cardo 1995).



(Cordon-Cardo 1995)

### 1.2.2 LA APOPTOSIS Y EL CICLO CELULAR.

La apoptosis se lleva a cabo por medio de la activación de un programa de autodestrucción intrínseco de la célula. La maquinaria básica de la apoptosis parece estar íntimamente relacionada con la del ciclo celular (Earnshaw 1995).

Existen diferentes propuestas de los posibles mecanismos que desencadenan la apoptosis, y la mayoría coincide en que este proceso puede activarse en varios puntos del ciclo vital de la célula, figura 1, por muy diversas señales que parecen venir del exterior (Anderson 1994).

Diferentes factores pueden inducir a la célula a tomar la decisión entre la vida y la muerte. Entre ellos están, la información del linaje celular, daño celular producido por radiaciones ionizantes o infección viral, factores de sobrevivencia extracelulares, interacciones celulares y hormonas. Estas señales pueden actuar tanto como supresoras o promotoras de la activación del programa de muerte celular y la misma señal puede actuar con efectos opuestos en tipos de células diferentes (Steller 1995). En la tabla 1 se mencionan algunos factores que experimentalmente han demostrado ser inductores o inhibidores de la apoptosis.

La inapropiada activación de la apoptosis, puede causar o contribuir a una gran variedad de enfermedades, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades neurodegenerativas o un choque isquémico mientras que la inhibición de este mecanismo induce la formación de neoplasias (Steller 1995).

TABLA I. INDUCTORES E INHIBIDORES DE LA APOPTOSIS

## INDUCTORES

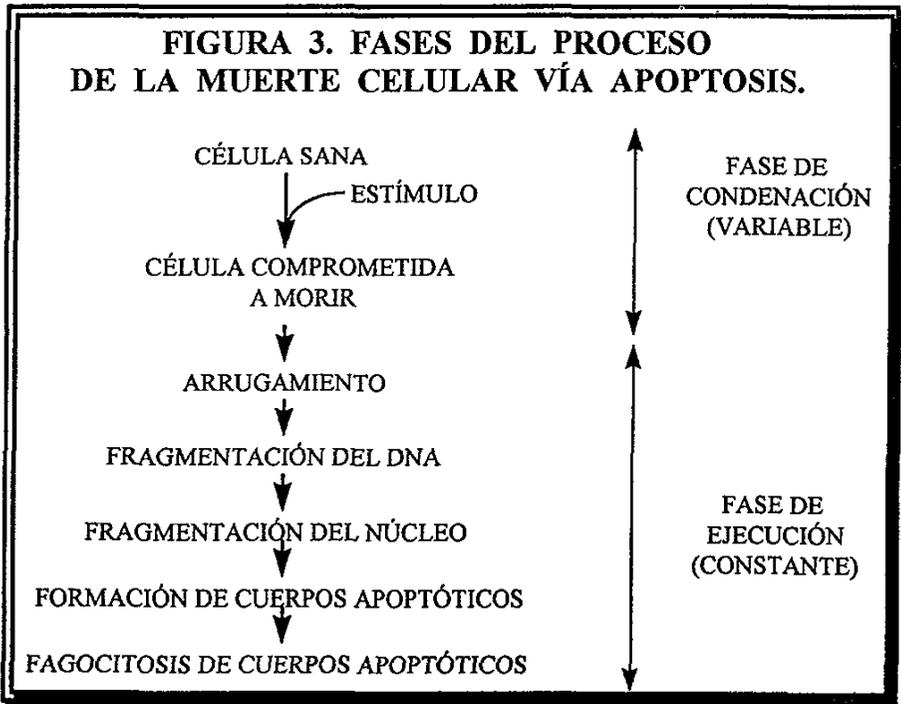
FISIOLÓGICOS	RELATIVOS A DAÑO	ASOCIADOS A LA TERAPIA	TOXINAS
Familia Fas	Choque térmico	Radiación gamma	Etolol
Factor de crecimiento transformante $\beta$	Genes supresores de tumores	Agentes Anticáncer citotóxicos	Péptidos $\beta$ -amieloides
Neurotransmisores	Infecciones virales	Ceramida	
Remoción de factores de crecimiento	Privación de nutrientes	Agentes quimioterapéuticos	
Perdida de las uniones de la matriz	Células T citolíticas	Radiación UV	
Calcio	Toxinas bacterianas		
Hormonas	Oxidantes		
ICE	Radicales libres		
BCL-x (corta)			
Factor de necrosis tumoral			

## INHIBIDORES

FISIOLÓGICOS	GENES VIRALES	AGENTES FARMACOLÓGICOS
Factores de crecimiento	Adenovirus E1B	Inhibidores de calpaina
Matriz extracelular	Baculovirus p35	Inhibidores de cistein proteasa
Ligandos CD40	Baculovirus IAP	Promotores de tumores
Aminoácidos neutros	Cowpox virus crmA	
Zinc	Epstein-Barr virus	
Estrógenos	Virus herpes	
Andrógenos	Virus de la fiebre africana	

(Anderson 1994, Thompson 1995, Steller 1995).

Existen diferentes propuestas de los posibles mecanismos que desencadenan la apoptosis, además, este proceso puede activarse en diferentes puntos del ciclo vital de la célula, precisamente, en las fases  $G_1$  y  $G_2$  del ciclo celular, en la fase  $G_0$ , durante la diferenciación y naturalmente una vez que la célula ha envejecido.

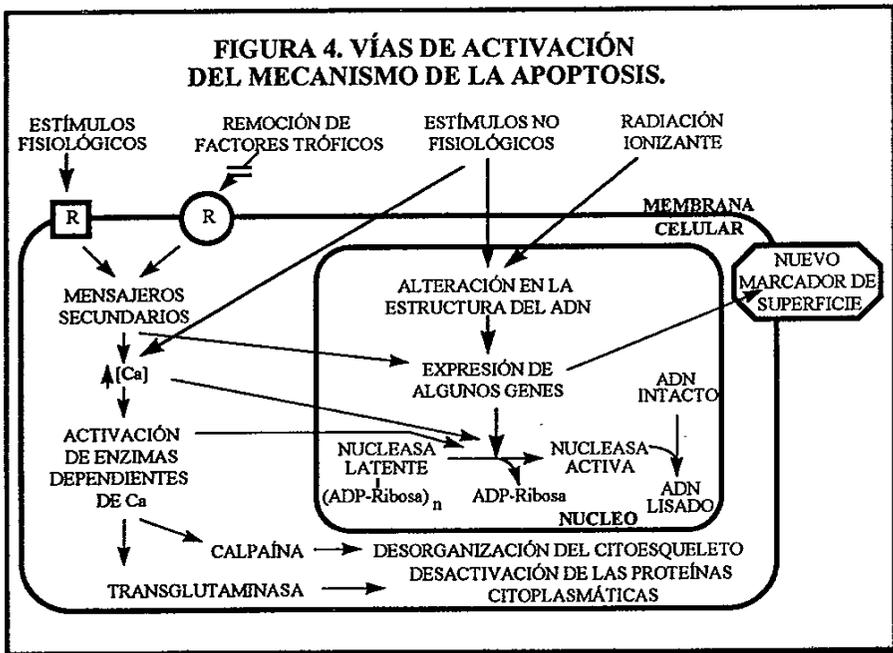


(Gerschenson 1992, Earnshaw 1995, Steller 1995)

Para que una célula entre en apoptosis debe de recibir un estímulo que desencadene una serie de eventos que darán como resultado la fragmentación del DNA y su inevitable muerte. Estos eventos pueden resumirse en la figura anterior, figura 3. Debemos notar que se compone de dos fases, la primera conocida como fase de condensación y que se

considera de tiempo variable y la segunda llamada fase de ejecución, periodo constante en la mayoría de las células estudiadas (Earnshaw 1995).

Durante mucho tiempo los investigadores creyeron que el proceso de la apoptosis era diferente para cada célula, pero ahora la explicación de las diferencias observadas entre los tejidos y organismos se atribuyen a las características inherentes de cada célula y al estímulo que desencadena dicho proceso (Steller 1995). Con la información recabada en el presente trabajo se presenta en la figura 4 las rutas de activación de la apoptosis y algunos aspectos conocidos de su mecanismo bioquímico.



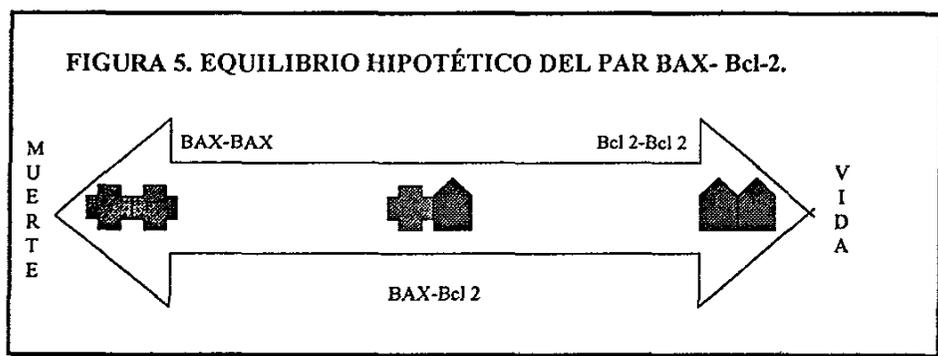
(Carson 1993, Schwartzman 1993, Martin 1993, Osborne 1994, Fuller 1994).

Como podemos observar en la figura 4, tanto los estímulos fisiológicos como la remoción de factores necesarios para la célula, producen la activación de receptores específicos localizados en la membrana celular, los cuales inducen la síntesis o activación de mensajeros secundarios específicos para cada estímulo, sin embargo, se ha observado que justo en este momento, ocurre una notoria elevación en la concentración de calcio citoplasmático (Schwartzman 1993), que desencadena la activación de ciertas enzimas como la calpaína, que al parecer se encarga de la desorganización del citoesqueleto, responsable del característico arrugamiento de la membrana celular, otra enzima dependiente de calcio es la transglutaminasa, que se supone es la responsable de la desactivación de las proteínas citoplasmáticas, este punto es muy importante porque que esta desactivación permite a las proteínas de la célula que muere a ser nuevamente útiles a las células que asimilan los cuerpos apoptóticos (Carson 1993). Debido a que el mecanismo de la apoptosis no ha sido plenamente dilucidado, aún se desconoce quien o como se activan los genes en el núcleo celular, pero es posible que la elevación de la concentración de calcio citoplasmático y/o ciertas enzimas, inducen la activación de una nucleasa unida a una o varias ADP-Ribosa, que se encarga de fragmentar la cadena de DNA. Otro punto sumamente importante es que la presencia de los mensajeros secundarios desconocidos o la presencia de estímulos no fisiológicos o de radiaciones, inducen la expresión de genes aún desconocidos pero que al expresarse activan un nuevo marcador en varias partes de la superficie de la membrana celular, el cual sirve para

reconocer posteriormente los cuerpos apoptóticos y estimular la fagocitosis de los mismos. La muerte celular *in vivo* es un proceso continuo normal controlado fisiológicamente de manera muy compleja. Esta forma de muerte celular se ha convertido en un punto central en las investigaciones de la biología del cáncer, la virología, la inmunología y las neurociencias, entre otras, pues los descubrimientos a nivel molecular permitirán aplicar su manipulación con propósitos terapéuticos.

Casi treinta años después la búsqueda no ha terminado, sin embargo, los resultados son alentadores. El conjunto complejo de genes que coordinan el proceso de muerte celular activa, así como sus productos, no ha sido hallado por completo y de hecho se cree que sólo se conoce una pequeña parte, pero se ha logrado inducir la apoptosis en cultivos de células malignas con productos específicos y con resultados similares *in vivo*, en ratones desnudos. Gracias a estos experimentos sabemos que en el ser humano el par de genes Bax y Bcl-2 son uno de los múltiples posibles “switches” que determinan que una célula viva o muera, quizá por una simple relación estequiométrica a través del mecanismo de la apoptosis, Korsmeyer plantea que el par Bcl-2-Bax determina cuando debe de aceptarse o ignorarse la orden de morir la célula, cuando las proteínas Bcl-2 están en exceso, todas las Bax se unen a ellas, las que sobran forman parejas unas con otras bajo estas condiciones la célula vive. Por otro lado, si Bax predomina, se une a todos los Bcl-2 y los sobrantes forman pares Bax-Bax en este caso la célula muere, figura 5. Esta hipótesis propone de una manera muy sencilla el equilibrio entre la vida y la

muerte fundamentandose en observaciones del par Bax-Bcl-2 y el control del suicidio celular. Aún no se sabe si estos son los únicos controladores de la muerte celular, pero si ésto es cierto, se podrían diseñar tratamientos que induzcan la apoptosis en células cancerosas, infectadas con virus, enfermedades neurodegenerativas o autoinmunes, con el empleo de estas proteínas (Barinaga 1994).



### 1.2.3 MÉTODOS DE ESTUDIO.

La morfología que distingue a la apoptosis ha sido descrita en detalle por las observaciones realizadas empleando microscopía electrónica y de luz (Kerr 1972).

Recientemente se ha desarrollado una técnica histoquímica simple que se basa en la unión de químicos específicos a los puntos de fragmentación durante el rompimiento del DNA (1). La fragmentación del DNA se puede detectar por la modificación de la deoxinucleotidil-transferasa (TdT), mediante deoxiuridina trifosfato (dUTP), método de

marcaje de cortes terminales o TUNEL (nick end labeling), después de una digestión con proteinasa K y de la remoción de la peroxidasa endógena, las secciones se incuban a 37°C por una hora en una solución que contiene TdT y dUTP. Posteriormente son tratadas con una solución de peroxidasa marcada con un anticuerpo anti-digoxigenin por 30 min. Los productos de reacción son revelados con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada y para su conteo se tiñen con verde de metilo. Para realizar un control negativo se sustituye con un buffer de fosfatos salino al TdT que contenga la digoxigenin marcada, dUTP y dATP, las cuales no tiñen (Desmouliere 1995, Terada 1995).

La apoptosis es muy fácil de reconocer en un cultivo o suspensión celular, por medio de una electroforesis, donde se observa una fragmentación característica del DNA causada por la activación de una endonucleasa (Terada 1995).

## 2. CÁNCER.

### 2.1 EL CÁNCER.

El término “cáncer” (palabra derivada del griego, *Karkinos*, cangrejo) se refiere a más de 100 formas de enfermedad. Casi todos los tejidos del cuerpo pueden sufrir un desequilibrio en la regulación de la proliferación celular, y algunos de tipo muy severo; cada cáncer tiene características únicas, puede iniciarse en cualquier órgano o tejido del cuerpo humano y afecta también a los animales (Weinberg 1996).

Los 30 mil millones de células que tiene un cuerpo sano normal viven en un condominio complejo e interdependiente, regulando su proliferación unas a otras, de tal manera que sólo se reproducen cuando las instrucciones para hacerlo son dadas por las células vecinas (Weinberg 1996). Esta estrecha relación da como resultado que cada tejido mantenga un tamaño y una arquitectura apropiada dentro del cuerpo (Steller 1995). En contraste, las células cancerosas violan este esquema, permanecen imperturbables a los controles normales de proliferación y siguen su propio ritmo de reproducción (Hartwell 1994, Osborne 1994).

### 2.2 ¿CÓMO SE DESARROLLA UN CÁNCER?

Después de varias décadas de investigación, la ciencia ha propuesto que el cáncer se desarrolla de una manera similar en la mayoría de los tejidos, es decir, es el resultado del daño del material genético.

Los genes son secuencias específicas de aminoácidos que se encuentran en las moléculas de DNA, ellos contienen la información necesaria para poder sintetizar proteínas particulares. Cuando los genes son activados las células responden sintetizando las proteínas que codifican dichos genes. Muchos carcinógenos dañan el DNA o interfieren con las enzimas necesarias para su correcta replicación. La célula puede responder adecuadamente a los daños pequeños y en la mayoría de las ocasiones a daños mayores: esto puede retrasar la división celular hasta que el daño es reparado, entrar en apoptosis o puede progresar sin interrupción a través del ciclo de crecimiento celular (Carson 1993). La transformación maligna no ocurre por un evento simple, es una evolución progresiva de las células somáticas para dar variantes con crecimiento descontrolado y con propiedades invasivas (Carson 1995). Las mutaciones en los genes pueden perturbar a la célula induciendo cambios en las cantidades o en la actividad de los productos protéicos (Lane 1992). Ahora, el hecho de que un grupo de células anormales aisladas proliferen de manera normal, no causan ningún daño, sin importar que otras desagradables propiedades puedan tener, pero si la proliferación esta fuera de control, originan un tumor o neoplasia (Shimkin 1979, Alberts 1994, Lodish 1995).

Dos clases de genes, los cuales solo constituyen una pequeña parte del equipo genético completo, juegan un papel muy importante en el inicio de un cáncer. En su configuración normal, estos organizan la compleja secuencia de eventos que componen el ciclo celular, los proto-oncogenes que se encargan de activar la proliferación celular y, los

genes supresores de tumores, que inhiben la proliferación (Gottesman 1994, Thompson 1995, Weinberg 1996). Cuando mutan, los proto-oncogenes inducen una excesiva multiplicación, por sobreproducción de la proteína estimuladora de crecimiento o una forma más activa. En contraste los genes supresores de tumores, por una mutación, pueden quedar inactivos, dando como resultado una pérdida de la funcionalidad de las proteínas que se encargan de detener la proliferación inapropiada de la célula (Gottesman 1994, Cordon-Cardo 1995, Lodish 1995).

Como es evidente, la homeostasis se pierde cuando los sistemas de reparación no pueden eliminar estas mutaciones permanentes. Ahora se sabe que para que un tumor se desarrolle, es necesario que ocurran media docena o más de mutaciones en los genes que controlan la proliferación celular, y que las células de un tumor son descendientes de una célula ancestral común. La proporción de la división y la muerte celular determina que tan rápido crece un tumor. Algunas células transformadas se dividen más lentamente que las normales, pero, en general, la vida de dichas células se prolonga más de lo normal (Carson 1993). Comúnmente deben transcurrir décadas antes de que un tumor sea palpable, una vez que se han alterado los genes que controlan el programa de proliferación. Como podemos ver, estos genes son la clave para entender el proceso del origen del cáncer (Levine 1994).

Cuando las células neoplásicas se encuentran agrupadas en una masa bien delimitada se dice que forman un tumor benigno y es completamente curable con la

remoción del conjunto celular. Pero si las células tienen la capacidad de invadir tejidos vecinos u órganos distantes se dice que el tumor es maligno, es decir, un cáncer. La invasividad es la capacidad de células malignas de desprenderse del grupo neoplásico, desplazarse por torrente sanguíneo o linfático y formar colonias secundarias en otras partes del cuerpo, la formación de estos tumores secundarios se conoce como metástasis. Otras dos importantes características del cáncer son: la anaplasia y la autonomía manifestada a través de la pérdida de la inhibición del crecimiento celular, dando como resultado una semindependencia en cuanto a la conducta y la función. Existen diferentes tipos de cáncer, clasificados de acuerdo al tejido y al tipo de célula donde se originan. De esta manera carcinoma es el cáncer originado en células epiteliales, sarcoma el que se origina en tejido conectivo o células musculares, leucemia el derivado de las células hematopoiéticas, entre otros. La más terrible característica del cáncer, es que cuando no se detecta a tiempo, lenta e irremediamente conduce al enfermo hacia la muerte, por lo que todos los demás daños son secundarios. (Shimkin 1979, Alberts 1994)

El como se desarrolla un cáncer ya no es un misterio. Durante las últimas décadas, aún cuando la investigación es complicada, lenta y cara, se ha avanzado en la identificación de las más profundas bases de este proceso, es decir, el nivel molecular, y es ahí donde también se puede encontrar el tratamiento para la enfermedad. Nadie puede asegurar con exactitud cual de las terapias puede emplearse como específica a nivel de

alteraciones moleculares contra las células cancerosas pues cada cáncer tiene características únicas, ahí la importancia de este trabajo de divulgación.

### 3. APOPTOSIS Y CANCER.

El equilibrio entre las tasas de proliferación y muerte celular es muy importante para mantener los tejidos en homeóstasis. La alteración de este equilibrio puede ser el factor más importante en el proceso multietapas de la tumorigénesis, y la inhibición de la apoptosis es una causa de esta alteración. Dentro del desarrollo de nuevas terapias para los tumores malignos a nivel molecular, la inducción de la apoptosis se perfila como una de las estrategias con mayores posibilidades de éxito.

Muchos carcinógenos dañan el DNA o interfieren con las enzimas necesarias para su correcta replicación. La apoptosis es un método muy eficiente para prevenir la transformación maligna de las células (Schiffer 1995), ya que las elimina en cuanto reconoce alguna lesión genética irreparable. La apoptosis anormal puede promover el desarrollo del cáncer, ya sea por la acumulación de las células transformadas en división o por la obstrucción de la remoción de variantes genéticas con alto potencial de malignidad. Aún no se conocen todos los factores que determinan el que una célula entre en apoptosis después de sufrir algún daño o que continúe a través del ciclo celular (Carson 1993).

Los genes que pueden inducir la apoptosis en células cancerosas continúan en investigación. Diferentes estudios han demostrado que el crecimiento de diferentes líneas celulares cancerosas, incluyendo colon, mama, osteosarcoma y células no pequeñas de pulmón puede ser funcionalmente inhibido por la transferencia del gen p53 en forma

nativa por un mecanismo aún desconocido (Thompson 1995). Se cree que éste está involucrado en la liberación de señales antiproliferativas que pueden ser capaces de antagonizar las señales de estimulación del crecimiento propagadas por los productos de los oncogenes, el efecto terapéutico potencial a nivel molecular de este gen ocupa la atención de muchos investigadores (Nagata 1995).

Paradójicamente, algunos de los mismos oncogenes que estimulan la división celular, tales como el *c-myc* participan en el proceso de la apoptosis. Las concentraciones de RNA de *c-myc* y proteínas tiene un incremento temprano durante la apoptosis y se ha observado que una sobreexpresión de este oncogen induce la apoptosis en fibroblastos (Carson 1993).

El oncogen *bcl-2*, llamado el gen “supresor de la muerte celular”, regula directamente el proceso de la apoptosis. Todas las células hematopoyéticas y linfoides, muchas células epiteliales así como neuronas contienen la proteína *bcl-2*, encontrada principalmente en membranas mitocondriales, núcleo y retículo endoplásmico. Los linfomas foliculares de las células-B, tienen altas concentraciones de la proteína *bcl-2*. Una proteína del virus Epstein-Barr incrementa la expresión del *bcl-2* en las células del linfoma de Burkitt. Comparado con los linfocitos B normales, aquellos que sobreexpresan el *bcl-2*, sobreviven más tiempo en los cultivos después de la privación de factores de crecimiento y son resistentes a radiaciones ionizantes y glucocorticoides. Altas concentraciones de *bcl-2* también protegen a la célula de la apoptosis inducida por *c-myc*.

La conexión entre la supresión de la apoptosis y el desarrollo de un cáncer podría ser el proto-oncogen *bcl-2*, el cual fue originalmente aislado de una translocación cromosomal fuertemente asociada con el linfoma folicular de células B. La capacidad de los productos del gen *bcl-2* para suprimir la apoptosis en varios tipos de células puede considerarse como un factor en el desarrollo del cáncer, sin embargo el mecanismo molecular aún no ha sido establecido. Otros oncogenes pueden tener efectos similares en la apoptosis. Por otro lado, la estimulación de la apoptosis puede ser una manera en la cual los genes supresores de tumores actúan en algunos tipos de células. Los productos normales del gen supresor de tumores *p53* puede inducir la muerte cuando se expresa en líneas celulares mieloides leucémicas donde normalmente no se encuentran, al mismo tiempo que en otras células *p53* inhibe la proliferación. La combinación de la inhibición de la proliferación por la remoción de factores de crecimiento con la incapacidad de mantener regulada la expresión del *c-myc* acelera la apoptosis en la línea 32D de células mieloides y en los fibroblastos Rat-1. Tanto *p53* como *c-myc* están muy relacionados en el control del destino de la célula y pueden contribuir en la regulación de la muerte celular así como en la proliferación. Estas observaciones pueden extenderse a otros tipos de células. Estos dos genes pueden ser, junto con otros, una importante conexión molecular entre el control de la apoptosis y la multiplicación (Schwartzman 1993).

Muchos tipos de cáncer sólidos, es decir los no hematológicos, son resistentes a la quimioterapia ya sea sola o en combinación con otros fármacos, con radiación o más

recientemente, en combinación con modificadores de respuesta biológicos tales como las hormonas. Si la idea que se gesta es correcta, el proceso de apoptosis tiene considerables aplicaciones potenciales, como una forma no citotóxica para la terapia del cáncer (Anderson 1994).

### 3.1 LA APOPTOSIS COMO TERAPIA PARA EL CÁNCER.

En esta sección se realiza una recopilación sistematizada de la información publicada recientemente acerca de la inducción de la apoptosis. A continuación se presenta de manera resumida los inductores probados de manera experimental en diferentes líneas celulares, así como su posible mecanismo de acción.

TABLA 2. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES.

INDUCTOR DE LA APOPTOSIS	CÉLULA BLANCO	MECANISMO DE ACCION
Gen p53 en forma nativa.	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC).	Posiblemente como un reflejo de la expresión de ARNm de p53.(Liu 1994,1995)
I-131-chimeric L6 (ChL6).	Cáncer de mama.	Una sobreproducción de el factor de crecimiento transformante $\beta_1$ y una expresión del ARNm de <i>c-myc</i> da como resultado u arresto celular en G <sub>1</sub> o apoptosis (DeNardo 1995).

Ácido caféico fenil ester (CAPE).	Fibroblastos de embrión de rata transformados con adenovirus tipo 5.	Probablemente el CAPE disminuya el crecimiento de las células por la inhibición del proceso oxidativo (generación de $O_2^-$ y $H_2O_2$ ) (Chiao 1995).
5'-azacitidina (AZC).	Células humanas promielocíticas leucémicas HL-60	Posiblemente el AZC induce una endonucleólisis específica en la fase $G_1$ del ciclo celular (Murakami 1995).
Linomida.	Células de cáncer prostático humano.	La linomida induce apoptosis debido a la inhibición de la angiogénesis en las líneas celulares (Vukanovic 1995).
Transferencia del gen Fas/APO-1.	Glioma maligno humano.	Expresión Fas/APO-1 y susceptibilidad al anticuerpo- Fas/APO-1 (Weller 1995).
Interferon- $\alpha$ .	Líneas celulares de cáncer de células escamosas de piel.	El mecanismo por el cual actúa el Interferon- $\alpha$ aún es desconocido, sin embargo, se sabe de las características citotóxicas, antiproliferativas e inmuno antitumorales que posee esta citocina y es posible que estas características estén involucradas en este proceso (Rodríguez-Villanueva 1995).
Sobreexpresión del gen BRCA1.	Células de cáncer de mama.	El mecanismo es similar a c-myc y p53 y es posible que los productos del gen actúen como reguladores de la transcripción (Shao 1996).
Expresión de una forma nativa del gen p53 con un vector adenoviral.	Células tumorales de próstata humana Tsu-pr1.	Desarrollo de una sobreexpresión de p53 en su forma nativa con el vector adeno viral (Yang 1995).
La combinación de un Ad-p53 con cis-platino.	Cultivo de células cancerosas no pequeñas de pulmón.	Inducción de un quimiosensibilidad al cis-platino por la transferencia de p53 (Fujiwara 1994).

Sobreexpresión del gen p53 en forma nativa mediante un adenovirus.	Células de melanoma.	El gen supresor de tumores p53 parece ser el responsable de la inhibición de la transición de G <sub>1</sub> a S (Cirielli 1995).
Ácidos biliarés.	Células Globet de cáncer colorectal.	Se desconoce la razón de la sensibilidad de estas células a los ácidos biliarés pero se cree que se encuentra relacionada con características específicas de la membrana, defensas antioxidantes intracelulares o transducción de señales (Garewal 1996).
Factor de crecimiento transformante $\beta_1$ .	Células malignas de epitelio de ovario.	Posiblemente inhibe la progresión del ciclo celular (Havrilesky 1995).
Castración.	Tumores prostáticos humanos.	La remoción de andrógenos elimina las células dependientes de ellos (Westin 1995).
Acido retinóico.	Células de carcinoma de ovario.	Estimulación de <i>c-myc</i> (Krupitza 1995).

La mutación o deleción del gen tumor supresor p53, es la alteración genética más frecuente reportada en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC). Las personas que padecen este tipo de cáncer a menudo sufren profundos efectos en el habla y al deglutir los alimentos, las terapias convencionales como la cirugía y la radioterapia además de requerir mucho tiempo, no dan el resultado esperado en muchos casos. La inducción de la apoptosis es una de las funciones del gen p53 en forma nativa. En 1994, Liu y col. indujeron una forma nativa de p53 en dos líneas celulares separadas de CECC, vía un vector adenoviral recombinante que contenía la forma nativa de p53 (Ad5CMV-

p53). Cuando los cultivos celulares de CECC humano fueron infectadas con con 100 unidades formadoras de placa/célula del Ad5CMV-p53, la histomorfología característica de la apoptosis apareció 4 hr después de la infección posiblemente como un reflejo de la expresión de ARNm de p53 y, rápidamente, se presentó la muerte celular. En los trabajos *in vitro* se observó la detención del crecimiento después de la infección con el vector, así como cambios en la morfología celular compatibles con la apoptosis. Los resultados *in vitro* fueron confirmados *in vivo* en ratones desnudos con la infiltración peritumoral del Ad5CMV-p53, y se observó que el crecimiento de los nódulos infectados con el vector fue inhibido casi 60 veces más que los controles, estos resultados sugieren que la proteína p53 en estado nativo tiene efectos terapéuticos potenciales en la terapia del CECC (Liu 1994).

Posteriormente, se comprueba que el efecto supresor tanto *in vitro* como *in vivo* es consecuencia de la apoptosis. Ambas líneas celulares de CECC infectadas con el Ad5CMV-p53 mostraron la fragmentación temprana del DNA nucleosomal en escalera característica. La replicación defectuosa del virus no produjo ningún efecto. El manejo del ISEL (*In Situ* end labeling) demostró que la apoptosis es el mecanismo implicado en la supresión del tumor *in vivo*. Es importante mencionar que los fibroblastos y una línea de queratinocitos humanos cariotípicamente normales (con un p53 en estado nativo endógeno) son insensibles al tratamiento con el Ad5CMV-p53, con lo que se ilustra la especificidad molecular y su inactividad en tejidos normales. Sin embargo Roth y col.

empleando el mismo procedimiento de inoculación de Ad5CMV-p53 en células cancerosas no pequeñas de pulmón (CCNPP) no encontró apoptosis. Esto nos hace suponer que las diferencias inherentes de cada neoplasia hacen que la apoptosis se regule de diferente manera. Finalmente concluyen que la inducción selectiva de la apoptosis en tumores malignos sólidos respetando las células normales es una atractiva estrategia para la terapia molecular y que estas investigaciones requieren de un mayor impulso (Liu 1995).

La radioinmunoterapia (RIT) se basa en la capacidad de liberar sistemáticamente radioterapia en moléculas que se concentran preferencialmente en tejidos tumorales, resultando una alta radiación terapéutica de acuerdo a la dosis de radiación, en relación con la dosis normal del tejido. Esta respuesta tumoral ha sido reportada en múltiples casos clínicos usando esta terapia en pacientes con linfoma avanzado, leucemia y cáncer de mama. Si bien esta regresión del tumor es probablemente el resultado de una dosis de radiación única, la amplitud de la respuesta a menudo excede la expectativa de la dosis estimada. Últimamente crece el monto de la información que sugiere que la apoptosis puede ser el mejor mecanismo de muerte celular tumoral por las bajas dosis de radiación (DeNardo 1995).

Para el estudio de la respuesta de las células humanas cancerosas a la RIT, DeNardo y col. eligieron el cáncer de mama con células implantadas en ratones desnudos, tratadas con Y-90-1,4,7,10-tetraazacyclododecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-peptide

ChL6 (Y-90-ChL6). Ellos observaron que hubo una respuesta celular que correspondía a las características de la apoptosis, empleando dosis bajas de radiación (100-700 rads). (DeNardo 1995).

El propolio es un exudado de la corteza de los árboles de coníferas y acarreado por las abejas hasta la colmena. Sabemos que este producto tiene una gran variedad de efectos benéficos, por medio de la información que se transmite entre generaciones, por la medicina tradicional. Algunas propiedades del propolio son los efectos anti-inflamatorios, antivirales, inmunoestimulatorios y carcinostático. El ácido caféico fenil éster (CAPE) es uno de los principios activos del propolio de la miel de abeja. En 1995, Chiao y col. encontraron que el CAPE, induce una alteración en el estado redox en fibroblastos del tipo 5 de embrión de rata transformados, produciendo apoptosis diferencial con las células normales, y también en cultivos de células humanas al parecer actuando sobre el balance de óxido-reducción en la generación  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . El Instituto Nacional del Cáncer en EU, ha reportado que entre  $5 \times 10^{-7}$  y  $1.4 \times 10^{-5}$  se encuentra la concentración molar efectiva del CAPE para inducir la muerte celular en líneas cancerosas. El CAPE se ha asociado como inhibidor de crecimiento quizás por la unión de citocinas, factores de crecimiento, y receptores específicos de la superficie celular a hormonas, los cuales controlan la generación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . El CAPE ha mostrado ser un inhibidor del proceso oxidativo un tanto mejor que otros agentes quimiopreventivos tales como el tamoxifen, (-)epigallocatequina galato, sarcocitol A y el pento-O-galoil-beta-D-glucosa (Chiao 1995).

El AZC es un conocido agente antileucémico y es usado como herramienta en el estudio de la metilación del DNA, en la diferenciación celular y en la activación de genes. El principal interés en el AZC es como posible fármaco anticáncer para tumores sólidos. El papel del AZC en leucemias no ha sido claramente definido, pero se ha observado actividad significativa en algunos tipos de leucemias. Existe una confusión entre la toxicidad del antimetabolito de la citidina, 5'-azacitidina (AZC) como consecuencia de su incorporación en RNA, DNA o ambos, debido a que la apoptosis parece ser el modo predominante de muerte celular tumoral dependiendo de su posición en el ciclo celular. Murakami y col. investigaron si la inducción de la apoptosis por AZC es específica para alguna fase del ciclo celular en células humanas promielocíticas leucémicas HL-60. Éstas fueron tratadas con varias concentraciones de AZC, y por medio de la citometría de flujo identificaron y cuantificaron las poblaciones de células apoptóticas y no apoptóticas. Ellos encontraron que las células tratadas con AZC en concentraciones de 2-6  $\mu\text{M}$  que se encontraban en la fase  $G_1$  del ciclo celular entraron en apoptosis y las células que estaban en la fase  $G_2$ -M, fueron particularmente resistentes. Con concentraciones de de entre 8-40  $\mu\text{M}$ , no se encontró especificidad a alguna fase del ciclo, en la inducción de apoptosis. Los datos sugieren que el mecanismo de muerte celular por AZC, es diferente dependiendo de su concentración y del tiempo, pues el máximo en la frecuencia de células apoptóticas se observa entre la 3<sup>o</sup> y la 4<sup>o</sup> hora. Se cree que el AZC dispara una endonucleólisis extensiva que es preferencial a las secciones DNA internucleosomales.

La morfología de las células afectadas es la típica de la apoptosis, de la misma “calidad” que otros fármacos en las células hematopoyéticas antitumorales. Probablemente actuando el metabolismo, la estabilidad de los RNAs y suprimiendo la síntesis de proteínas antes del punto crítico  $G_1$  y previniendo la entrada en S. Se puede especular que si el AZC a bajas dosis es preferencialmente específico para la fase  $G_1$ , puede ser más efectivo en combinación con fármacos fase S específicos, y en el tratamiento de tumores con alta proporción de células en  $G_1$ . La aparente resistencia de las células que están en  $G_2$ -M al AZC puede ser el reflejo de la disminución de la síntesis de ARN en las mismas. La estrategia a seguir es la prueba clínica de fármacos antitumorales en combinación con otros fármacos específicos a ciertas fases del ciclo celular. Finalmente debido a la propensibilidad excepcional de las células HL60 a la apoptosis, debe tenerse mucha precaución a las generalizaciones con otros sistemas celulares (Murakami 1995).

Vukanovic y col. encontraron que las células de cáncer de prostata humana son sensibles a la inducción de la muerte por hipoxia causada con linomida por la inhibición de la angiogénesis tumoral, independiente de andrógenos, al xenotransportarlas a ratones SCID. La inhibición de la angiogénesis incrementa la muerte en las líneas celulares TSU y DC-3 cancerosas. Estos estudios demostraron que el tratamiento con linomida disminuye la densidad capilares. Las células de cáncer de prostata humana tienen un grado de proliferación notoriamente bajo cuando han metastatizado a hueso y se han vuelto independientes de andrógenos. Los pacientes con células cancerosas prostáticas

con este tipo de proliferación tan baja, tratados con agentes quimioterapéuticos actuales, en muy pocas ocasiones tienen éxito. Por ello continúa la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de este tipo de cáncer. Una de estas alternativas es inhibir la respuesta angiogénica en los depósitos de cáncer localizados y metastásicos, dando como resultado una muerte celular tumoral por hipoxia. La linomida es un agente que inhibe la angiogénesis y el flujo sanguíneo en una variedad de cáncer prostático de rata independiente de su tasa de crecimiento, sensibilidad a andrógenos o capacidad metastásica (Vukanovic 1995).

Los gliomas malignos humanos son neoplasias altamente agresivas y muy resistentes a las terapias actuales incluyendo la inmunoterapia con anticuerpos dirigidos. Las células del glioma sintetizan una molécula inmunosupresiva muy potente inicialmente llamada derivada de células de glioma, factor supresor de las células T, y que después de la purificación y clonación fue identificado como un miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$  y es conocido como TGF- $\beta_2$ . Factores inmunosupresores como el TGF- $\beta$  pueden contribuir a la ausencia de respuesta de las células T tumor específicas en padecimientos como el glioma maligno vía inducción de la apoptosis en las células T. Las células T citotóxicas pueden asesinar sus células blanco por lisis dependiente de porfirina o por apoptosis dependiente de Fas/APO-1. Fas/APO-1 es la proteína receptora de citocina transmembranal de la superfamilia de receptores para el factor de crecimiento del nervio y TNF $\alpha$ , las cuales son señales de apoptosis. El ligando natural de Fas/APO-1 es una

citocina citotóxica con una gran homología al TNF- $\alpha$  y la linfotoxina/TNF- $\beta$ , el papel de Fas/APO-1 en el sistema inmune incluye un control negativo que da como resultado la eliminación de células T activas. La expresión aberrante de Fas/APO-1 por varias células neoplásicas ha fomentado el interés de este gen como blanco en la terapia inmunológica del cáncer por anticuerpos dirigidos. Weller y col. Recientemente reportaron que las líneas celulares de glioma maligno expresan Fas/APO-1 y son susceptibles a la apoptosis mediante el anticuerpo Fas/APO-1, por lo que se considera como una nueva posible estrategia inmunoterapéutica. (Weller 1995).

Los cánceres de piel, son los tumores malignos más comúnmente diagnosticados en Norte América, se ha estimado una incidencia anual de 700 000 casos. Es bien sabido que el desarrollo de cualquier tumor maligno es un proceso multietapas. Las alteraciones genéticas moleculares que ocurren en la mayoría de los cánceres de piel aún están caracterizados de manera incompleta, pero se ha demostrado que las mutaciones en el gen tumor supresor p53 ocurre en alta incidencia tanto en carcinomas escamosos como basales. Las mutaciones activadoras se encuentran íntimamente relacionadas con los de la familia del gen ras, que también se ha caracterizado en el cáncer humano de piel. Adicionalmente el oncogen bcl-2 se expresa en altos niveles. Los genes reguladores del crecimiento tales como ras, p53 y bcl-2 han demostrado su influencia en la susceptibilidad de las células para entrar en apoptosis. La intervención quirúrgica es el tratamiento elegido para la mayoría de los cánceres basocelulares y escamosos en la piel, con una

efectividad del 95% de los pacientes. Sin embargo, los casos cosméticos y algunos mas voluminosos no siempre necesitan cirugía. El interferon- $\alpha$  es una citocina muy efectiva en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo los de la piel, la respuesta biológica de las células al IFN- $\alpha$  incide en la supresión del crecimiento y en la inmunosupresión, pero en 1995, Rodriguez-Villanueva, encontró que induce apoptosis en cultivos de líneas celulares cancerosas de piel escamosa. (Rodriguez-Villanueva 1995).

El cáncer de mama es una de los tumores malignos más comunes que afectan a las mujeres en los Estados Unidos y aunque el cáncer de ovario es menos frecuente, éste es la cuarta causa de muerte en las mujeres de ese país. Estos dos tipos de cáncer son susceptibles al gen BRCA1. Tratando de descubrir el papel de este gen en el proceso de la apoptosis, Shao y col. encontraron que al deprivar suero o calcio ionóforo las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con BCRA1 transfectado, presentaban muerte celular programada, lo cual les hace suponer que los genes BCRA1 juegan un papel crítico en la regulación de la apoptosis. (Shao 1996).

El cáncer de próstata es el cáncer más diagnosticado en el hombre y la segunda causa de muerte en los Estados Unidos. Grandes avances se han logrado desde que se descubrió que este tipo de cáncer requiere de la presencia de andrógenos para su desarrollo y el crecimiento del tumor. La castración ha sido el tratamiento de rutina por muchos años, pero cuando el cáncer ha metastatizado ningún método es efectivo. Datos recientes indican que el cáncer metastático de próstata y líneas celulares de cáncer de

próstata contienen mutaciones o deleciones en el gen *p53*. En 1995, Yang y col. encontraron que la infección de células Tsu-pr1 de próstata humana independientes de andrógenos con *p53* funcional por medio de un vector adenoviral, producían altos niveles de la proteína *p53* de 10 a 15 h, y presentaban fragmentación del DNA nuclear después de 24 h de infección. Ellos concluyen que este es un método muy eficiente para inhibir el crecimiento de tumor en próstata y el manejo del proceso de muerte celular programada puede ser empleado con aplicaciones clínicas (Yang 1995).

La inducción de la apoptosis por fármacos quimioterapéuticos o radiaciones ionizantes puede estar relacionado con los niveles del gen *p53*, pues estos estímulos dañinos producen una elevación de la proteína *p53*, pero si el daño es severo la reparación es imposible y *p53* puede disparar el proceso de muerte celular, por lo tanto altos niveles de *p53* pueden contribuir a la inducción de muerte celular apoptótica tumoral por agentes quimioterapéuticos. En la línea H358 de células no pequeñas de pulmón humanas Fujiwara y col. transfirieron por medio de un adenovirus recombinante el gen *p53*, y observaron un marcado incremento de la sensibilidad celular al cis-platino, así como la fragmentación característica del DNA que ocurre durante la apoptosis. Sus resultados soportan la aplicación clínica de un régimen que combine el remplazo del gen *p53* en forma nativa por medio del adenovirus con los fármacos empleados en el tratamiento de los cánceres humanos (Fujiwara 1994).

Los melanomas son tumores sumamente agresivos que tienen una alta incidencia en Norte America, Europa y Australia. Actualmente la cirugía, la quimioterapia y la inmunoterapia son el tratamiento para los melanomas, pero desafortunadamente la inmunoterapia es poco efectiva cuando el melanoma ha producido metástasis. Cirielli y col. examinaron el efecto de un adenovirus que sobreexpresa la forma nativa de p53 en líneas celulares de melanoma humano y murinos, encontrando que dicha sobreexpresión inhibe el crecimiento de los tumores *in vitro* e *in vivo* en ratones desnudos, resultado de la apoptosis celular (Cirielli 1995).

Existe un gran interés en encontrar marcadores biológicos que puedan ser usados en la identificación de sujetos y poblaciones con un alto riesgo al cáncer. Adicionalmente a su uso potencial, los marcadores pueden servir para determinar los puntos del proceso multietapas de esta enfermedad. En el colon expuesto a una gran cantidad de carcinógenos, incluyendo la dieta alta en grasas, se ha observado que la concentración de los ácidos biliares fecales también se elevan, induciendo apoptosis en las criptas colónicas principalmente en las células globet maduras. En el estudio de Garewal y col. comparan el grado de apoptosis en mucosa colorectal aparentemente normal de pacientes con un historial de cáncer de colon contra otros que no han padecido cáncer o solamente pequeños polipos. A los dos tipos de biopsias se les adicionaron pequeñas dosis de ácidos biliares y se cuantificaron las células globet en apoptosis y se encontró que los pacientes con cáncer colorectal tenían una disminución significativa en su porcentaje de células

apoptóticas. En este estudio inicial concluyeron que esta prueba de inducción de apoptosis con ácidos biliares en células globet puede ser usado como marcador de riesgo de cáncer de colon (Garewal 1996).

Los factores de crecimiento transformante (TGF)  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , son producidos por los humanos e inhiben la proliferación de una amplia gama de células, incluyendo las epiteliales, los hepatocitos y las hematopoyéticas. A través de un sistema de transducción de señales aún desconocido, se ha comprobado que la actividad biológica de los TGF- $\beta$ , es dependiente de la presencia de receptores de membrana de la serin/treonin cinasa I y II. Uniéndose a estos receptores se inicia una cascada de eventos moleculares que culminan con un incremento en la actividad de la cinasa 4 dependiente de ciclina, la cual impide la progresión de  $G_1$  a S. Anteriormente Havrilesky, había estudiado el efecto de TGF- $\beta$  en la proliferación de cultivos celulares de células epiteliales de ovario humano normales y malignos, encontrando una inhibición en el crecimiento del 40-70% (Berchuck 1992), pero en este estudio concluyen que el TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de pero no induce apoptosis en células epiteliales de ovario normales, sin embargo, algunas células cancerosas inhibidas en su crecimiento por TGF- $\beta$  también entran en apoptosis (Havrilesky 1995).

La remoción de andrógenos tróficos por castración química o quirúrgica, ha sido desde hace 50 años la terapia común para el carcinoma prostático. Inicialmente la mayoría de los pacientes se veían beneficiados por una reducción en el dolor y otros

síntomas, pero casi todos estos tumores regresaban con un fenotipo más agresivo, con crecimiento independiente de andrógenos. En la próstata normal, los andrógenos inducen profundos cambios en las células, incluyendo la muerte apoptótica. En este artículo, Westin y col. determinaron por medio de la fotometría, anticuerpos monoclonales y métodos *in situ* a las células apoptóticas en biopsias de próstata después de la castración. Ellos encontraron que el índice apoptótico se incrementó significativamente (Westin 1995).

Todos los ácidos trans retinóicos (ATRA) son productos metabólicos de los  $\beta$ -carotenos y el retinol. Son reguladores del crecimiento y moduladores de procesos biológicos tales como las funciones inmunes y la diferenciación epitelial. Es posible que estos procesos sean mediados por el ácido retinoico o por el retinol. *In vitro*, los ATRA se han usado para inducir la diferenciación de las células de linfoma, pero también ha funcionado sobre las células de los tejidos sólidos, como los neuroblastomas, teratocarcinomas y células de melanoma. Esta sustancia morfogénica también inhibe la progresión de las células del carcinoma de las células no pequeñas de pulmón y detienen el crecimiento de otros sistemas celulares.

En este estudio se investigaron los efectos del ATRA en el crecimiento de la línea celular N.1 del adenocarcinoma de ovario humano y se encontró que con una dosis entre 5 y 10  $\mu\text{M}$  se inducía la muerte celular por una sobre regulación de *c-myc* (Krupitza 1995).

#### 4. CONCLUSIONES.

La apoptosis tiene una importancia semejante a la mitosis, pues el equilibrio entre estos dos eventos esenciales da como resultado el control de la población celular en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano. La apoptosis fue poco estudiada hasta la década de los 70's cuando se describió únicamente en el aspecto morfológico y desde entonces continúa la investigación de los mecanismos responsables de ella. (Schwartzman 1993, Barinaga 1994). En los últimos años se ha fortalecido la hipótesis de que la apoptosis puede ser la etapa final de la diferenciación (Gerschenson 1992, Kane 1995).

Desde que la apoptosis es considerada como la muerte celular *in vivo*, se ha pensado que la supresión específica de alguno de sus componentes esenciales, puede contribuir de manera sustancial al desarrollo de un cáncer (Schwartzman 1993).

Kane propone que el uno de los retos más importantes de los científicos es encontrar el papel de la apoptosis en la patogénesis de las enfermedades humanas clasificadas como autoinmunes, como el cáncer (Kane, 1995).

Desde el principio, y quizás el principal objetivo, de su investigación ha sido el conocer la maquinaria para disparar la muerte controlada de células indeseables como las de los tumores malignos y, por otro lado, más recientemente evitar la muerte de células indispensables como ocurre en la enfermedad de Alzheimer o en el SIDA. Adicionalmente a su importancia en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, la supresión específica de la apoptosis podría ser un proceso importante que afecte la sensibilidad de

las células tumorales hasta el rango de terapia para el cáncer. La eliminación de las células que componen un tumor canceroso puede llevarse a cabo por medio de la inducción de apoptosis, por ejemplo, con radiación ionizante o con fármacos citotóxicos (Martin 1993, Fujiwara 1994, Cordon-Cardo 1995).

Bcl-2 e ICE son dos piezas clave del rompecabezas de la muerte celular, y con el tiempo, los investigadores descubrirán como recibe la superficie celular la orden molecular de morir y la transmisión de este mensaje dentro de la célula. Por otro lado, existe un grupo de investigadores que comparten la idea de que la apoptosis tiene algunos elementos en común con el ciclo de división celular (Barinaga 1994).

Considero que conforme se avance en las investigaciones acerca de la maquinaria bioquímica que dispara y regula de manera natural el proceso de la apoptosis también se desarrollarán de manera paralela los fármacos que logren, por un lado, activar este fenómeno para eliminar células o tumores indeseables y, por el otro, evitar que mueran células indispensables para el cuerpo humano, pero por el momento, el objetivo principal es conocer todas las partes del rompecabezas de la muerte celular programada.

Creo que hay que tener mucho cuidado en cuanto al manejo de las conclusiones a las que han llegado los investigadores mencionados en el presente trabajo pues, aún cuando los resultados son alentadores en los cultivos celulares y en ratones desnudos, las condiciones de experimentación son diferentes a las que se encuentra un tumor maligno *in situ*. Quizás muy pronto, la apoptosis llegue a ser en efecto, un punto estratégico para el

tratamiento de neoplasias tanto benignas como malignas, pero por el momento, solo puede pretender ser un complemento a las terapias convencionales hasta su completa dilucidación.

Desde mi punto de vista, tomando en cuenta los trabajos aqui presentados, considero que una combinación de estrategias, por ejemplo la inmunoterapia dirigida a marcadores tempranos o proteínas específicas cada tejido, podría ser un método eficiente para la terapia para el cáncer, pues las características de cada tejido hacen que la enfermedad presente cualidades especiales en cada caso. Finalmente por medio de esta tesis resalto lo atractivo de estas líneas de investigación para todo el equipo de salud, incluyendo y de manera sobresaliente, al químico farmacéutico biólogo, invitándolo a desarrollar este campo de investigación.

## GLOSARIO.

**Anaplasia:** Situación de un tejido en el que las células adultas están menos diferenciadas que las que les dieron origen.

**Picnosis:** Alteración del núcleo celular, aumentando su afinidad por los colorantes, disminuyendo de tamaño y perdiendo su estructura.

**Cariorrhexis:** Fragmentación del núcleo celular.

**Neoplasia:** Literalmente “cambio de forma” transformación de un tejido completamente diferenciado de cierto tipo a otro, debido a condiciones anormales. Formación, en alguna parte del cuerpo, de un tejido cuyos elementos substituyen a los de los tejidos normales.

**BIBLIOGRAFIA.**

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., (1994), Molecular biology of the cell, 3<sup>a</sup> ed., Garland, U.S.A., 1294 pags.
- Anderson, K., Harris, J., Bonomi, P., (1994), Potential applications of apoptosis in modifying the biological behavior of therapeutically refractory cancers. Medical Hypotheses, 43:207-213.
- Barinaga, M., (1994), Cell suicide: By ice, not fire, Science, 263:754-6.
- Berchuck, A., Rodríguez, C., Olt, J., Boente, P., Whitaker, S., Arrick, B., (1992), Regulation of growth of normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cell lines by transforming growth factor- $\beta$ , Am. J. Obstet. Gynecol. 166: 676-684.
- Carson, D., Lois, A., (1995), Cancer progression and p53, The Lancet, 346: 1009-1011
- Carson, D., Ribeiro, J., (1993), Apoptosis and disease, The Lancet, 341: 1251-1254.
- Chiao, C., Carothers, A., Grunberger, D., Solomon, G., Preston, G., Barrett, J., (1995), Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. Cancer Res., 55:3576-3583.
- Cirielli, C., Riccioni, T., Yang, C., Pili, R., Gloe, T., Chang, J., Inyaku, K., Passaniti, A., Capogrossi, C., (1995), Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in melanoma cell apoptosis *in vitro* and *in vivo*, Int. J. Cancer, 63:673-679.
- Clark, P., Clark, S., (1995), Historic apoptosis, Nature, 378: 230.

- Cordon-Cardo, C., (1995), Mutation of cell cycle regulators, biological and clinical implications for human neoplasia, *Am J Pathol*, 147: 545-560.
- DeNardo S., Gumerlock, P., Whinhrop, M., Mack P., Chi, S., Lamborn, K., Shen, S., Miers, L., De Vere, R., DeNardo G., (1995), Yttrium-90 chimeric L6 therapy of human breast cancer in nude mice and apoptosis-related messenger RNA expression, *Cancer Res*, 55:5837s-5841s.
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., Gabiani, G., (1995), Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 146: 56-66.
- Dorland. (1989), *Diccionario médico de bolsillo*. 23 ed., Interamericana, McGraw-Hill, 898 pags.
- Duke, R., Ojcius, D., Young, J., (1996), *Sci Am*, N° 6, Dec, 275:80-87.
- Earnshaw, W., (1995), Nuclear changes in apoptosis. *Curr op cell biol*, 7: 337-343.
- Fujiwara, T., Grimm, E., Mukhopadhyay, T., Zhang, W., Owen-Schaub, L., Roth, J., (1994), Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res*, 54: 2287-2291.
- Fuller, K., Issels, R., (1994), Cancer and the heat shock response, *Eu J Can*, 30A: 1884-1891.

- Garewal, H., Bernstein, H., Bernstein, C., Sampliner, R., Payne, C., (1996), Reduced bile acid-induced apoptosis in "normal" colorectal mucosa: a potential biological marker of cancer risk. *Cancer Res*, 56: 1480-1483.
- Gerschenson, L., Rotello, R., (1992), Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*. 6:2450-2455.
- Gottesman, M., (1994) Report of a meeting: Molecular basis of cancer therapy, *J Natl Can Inst*, 86: 1277-1285.
- Hartwell, L., Kastan, M., (1994), Cell cycle control and cancer, *Science*, 266: 1821-28.
- Havrilesky, L., Hurteau, Whitaker, R., Elbendary, A., Wu, S., Rodríguez, G., Bast, R., Berbeck, A., (1995), Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res*, 55: 944-948.
- Hockenbery, D., (1995), Defining apoptosis, *Am J Pathol*, 146:16-19.
- Kane, A., (1995), Redefining cell death. *Am J Pathol*, 146: 1-2.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., (1972), Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239-57.
- Krupitza, G., Hulla, W., Harant, H., Dittrich, E., Kallay, E., Huber, H., Grunt, T., Dittrich, C., (1995), Retinoic acid induced death of ovarian carcinoma cells correlates with *c-myc* stimulation, *Int. J. Cancer*, 61: 649-657.
- Lane, D.P., (1992), p53, guardian of the genome, *Nature*, 358:15-6.

- Lazbnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G., Earnshaw, W.C., (1993), Nuclear events of apoptosis in vitro in cel-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol.* 123:7-22.
- Levine, A., Perry, M., Chang, A., Silver, A., Dittmer, D., Wu, M., Welsh, D., (1994), The 1993 Walter Humbert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis, (1994), *Br. J. Cancer.* 69: 409-416.
- Liu, T., El-Nagar, A., McDonnell, T., Steck, K., Wang, M., Taylor D., Clayman G., (1995), Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in scamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer Res*, 55:3117-3122.
- Liu, T., Zhang, W., Taylor, D., Roth, J., Goepfert, H., Clayman G., (1994), Growth supression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wuld-type p53 gene via a recombinant adenovirus, *Cancer Res* 54: 3662-3667.
- Lodish, (1995), Apoptosis: final control point in cell biology, *Trends in Cell Biol*, 2: 263-267.
- Lodish, H., et. al., (1995), *Molecular cell biology*, 3<sup>a</sup> ed., Scientific American Books, U.S.A. 1344 pags.
- Majno, G., Joris, I., (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146:3-15.
- Martin, S., (1993), Apoptosis: suicide, execution or murder?, *Trends in Cell Biol*, 3:141-144.

- Murakami, T., Li, X., Gong, J., Bhatia, U., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., (1995),  
Induction of apoptosis by 5-azacytidine: drug concentration-dependent differences  
in cell cycle specificity. *Cancer Res*, 55: 3093-3098.
- Nagata, S., Golstein, P., (1995), The fas death factor, *Science*, 267:1449-1456.
- Nakamura, T., Pichel, J., et al, (1995), An apoptotic defect in lens differentiation caused by  
human p53 is rescued by a mutant allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6142-  
6146.
- Osborne, B., Schwartz, L., (1994), Essential genes that regulate apoptosis, *Trends in Cell  
Biol*, 4:394-399.
- Real Academia Española, (1984), *Diccionario de la lengua española*, Tomos I y II.  
Espasa-Calpe, España.
- Rodríguez-Villanueva, J., McDonnell, J. T., Induction of apoptotic cell death in non-  
melanoma skin cancer by interferon- $\alpha$ , *Int. J. Cancer*, (1995), 61: 110-114.
- Rubin, L., Philpott, K., Brooks, S., (1993), The cell cycle and cell death, *Curr Biol*, 3:391-  
4.
- Sachs, L., Lotem, J., (1993), Control of programmed cell death in normal and leukemic  
cells: New implications for therapy, *Blood*, 82:15-21.
- Sainz de Robles, F., (1986), *Diccionario Español de sinónimos y antónimos*, Aguilar,  
España, 1149 pags.

- Schiffer D., Cavalla, P., Migheli. A., Chiò, M., Giordana, S., Marino, A., Attanasio, A., (1995), Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors, *Neurosci Lett*, 195: 81-85.
- Schwartzman, R., Cidlowski, J., (1993), Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endoc Rev*, 14: 133-151.
- Shao, N., Li, Y., Shyam, E., Reddy, P., Rao, N., (1996), Induction of apoptosis by the tumor supressor protein BRCA1, *Oncogene*, 13: 1-7.
- Shi, L., Nishioka, W., Th'ng, J., Bradbury, M., Litchfield, D., Greenberg A., (1994), Premature p54<sup>cdc2</sup> activation required for apoptosis, *Science*, 263: 1143-1145.
- Shimkin, M., (1979), *Contrary to nature*, U.S. Departament of health, education and welfare, 498 pags.
- Steen, E.B., (1971), *Dictionary of biology*, Barnes & Noble, U.S.A.,.
- Steller, H., (1995), Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, 267: 1445-1449
- Stewart, B. (1994), Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 86: 1286-1296.
- Strasser,A., Harris,A., et al, (1994), DNA damage can induce apoptosis in proliferating limphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitabile by bcl-2. *Cell*, 79: 329-339.
- Szende, B., Zalatnai, A., Scally, V., (1989) Programmed cell deth (apoptosis) in pancreatic cancers of hamsters after treatment whit analogs of both luteinizing

- hormone-releasing hormone and somatostatin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 1643- 1647.
- Terada T., Nakanuma, Y., (1995), Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. Am J Pathol, 146:67-74.
- Thompson, C., (1995), Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science, 267:1456-1462.
- Vaux, D., Haecker, G., et al, (1994), An evolutionary perspective on apoptosis, Cell, 76: 777-779.
- Vukanovic, J., Issacs, J., (1995), Human prostatic cancer cells are sensitive to programmed (apoptotic) death induced by the antiangiogenic agent linomide, Cancer Res, 55:3517-3520.
- Weinberg, R., (1996), How cancer arises, Sci Am, Sep, N° 3, 275:32-40.
- Weller, M., Malipero U., Rensig-Ehl, A., Barr, P., Fontana, A., (1995), Fas/APO-1 transfer for human malignant glioma, Cancer Res, 55:2936-2944.
- Westin, P., Stattin, Damberg, J., Bergh, A., (1995), Castration therapy rapidly induces apoptosis in minority and decreases cell proliferation in a majority of human prostatic tumors, Am J Pathol, 146: 1368-1375.
- Woronicz, J.D., Calnan, B., Ngo, V., Winoto, A., (1994), Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell Hybridomas, Nature, 367:277-84.

- Wyllie, A.H., (1980), Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284:555-6.
- Yanahira, K., Tsumuraya, M., (1992), Transforming growth factor  $\beta_1$  induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cell, *Cancer Res.*, 52:4042-4045.
- Yang, C., Cirielli, C., Capogrossi, M. C., Passaniti, A., (1995), Adenovirus-mediated wild-type *p53* expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of prostatic tumor cells, *Cancer Research*, 55: 4210-4213.
-