

2ef



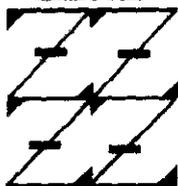
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

"DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE  
CITOCINAS EN CELULAS INDUCIDAS  
A LA APOPTOSIS"

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
ALBERTO PARRA BARRERA

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO NUMERO OYE  
DE NUESTRA REFLEXION

ASESOR: DR. ISAAC RODRIGO ZAMBRANO R.

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
BARRA DE ORIGEN

271040

1999



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.

**EL PRESENTE RABAJO SE LLEVÓ ACABO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA", UNAM., BAJO LA DIRECCIÓN DE EL DR. ISAAC RODRIGO ZAMBRANO RAMÍREZ.**

## DEDICATORIA

*A mis padres*

*Doroteo y Rosalia quienes me han ofrecido su amor, comprensión, apoyo incondicional y por sus consejos para alcanzar una de mis metas, de todo corazón "GRACIAS".*

*A mis hermanos*

*Angel, Elvira, Esperanza, Nami, Francisca y Patricia, quienes siempre me han ofrecido su apoyo, amistad y cariño.*

*A mi abuelita*

*Cándida a quien quiero y admiro.*

*A mis tíos*

*Pedro, Bartolomé, Jesús, por sus consejos y apoyo incondicional.*

*A Gisela*

*por su apoyo incondicional, confianza y cariño.*

*A mis siempre cuñados*

*Noé Bahena, Carlos Zamora y Alberto Morelos.*

*Así mismo a todos mis grandes amigos, quienes me han regalado el tesoro más preciado : su amistad.*

## AGRADECIMIENTOS

*Especialmente a el Dr. Isaac Rodrigo Zambrano R. por su apoyo en la realización de este trabajo y sugerencias.*

*Al Dr. Benny Weiss Steider por haber creado el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer y por sus sugerencias.*

*A los miembros del Jurado.*

*Dr. Benny Weiss Steider.*

*Dr. Isaac Rodrigo Zambrano R.*

*M. en C. Rosalva Rangel C.*

*Médico Cirujano. Raúl Zavala C.*

*Biol. Jorge Hernández M.*

*Por su disposición en todo momento y sugerencias para la realización de este trabajo.*

*A los miembros del laboratorio*

*M. en I.B.S.H. Alberto Monroy G.*

*Dr. Edelmiro S. Osorio.*

*M. en C. Fabian Flores B.*

*M. en C. Luis Sánchez S.*

*M. en C. Juan J. Montesinos.*

*y*

*Al Sr. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su valiosa colaboración técnica.*

## Abreviaturas

**[<sup>3</sup>H]T** : Timidina marcada con el radionucleótido tritio.

**5FU** : 5-Fluorouracilo

**ADN-PK** : Proteína cinasa dependiente de ADN

**ADN** : Ácido Desoxiribonucleico

**ARN** : Ácido Ribonucleico

**ATP** : Adenosin Trifosfato

**CD** : Grupos de Diferenciación

**CFS's** : Factores Estimuladores de Colonias

**Cis** : Proteasa Cisteinas

**CMTH** : Célula Madre Totipotencial Hematopoyética

**CPH** : Célula Pluripotencial Hematopoyética

**D.O.** : densidad óptica

**ELISA** : Ensayo de Inmunofluorescencia de Unión Acoplada a una Enzima

**FADD** : dominio de muerte asociado al receptor Fas

**Fas** : Ligando Fas

**FasR** : Receptor para Fas

**ICE** : Enzima Convertidora de la Interleucina-1 $\beta$

**IMDM** : Medio Dulbecob Modificado Iscove

**LDS0** : Dosis Letal Media (50%)

**LPS** : Lipopolisacárido

**MAR** : Regiones asociadas a la matriz

**MTT** : 3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

**PARP** : Polimerasa poly-(ADP-ribosa)

**pb** : pares de bases

**PBS : Solución Buffer de fosfatos**

**PCD : Muerte Celula Programada**

**RAIDD : Proteína asociada a RIP a través de un dominio de muerte**

**RIP : Proteína asociada al receptor del TNF**

**RPMI 1640 : Medio de cultivo**

**S.C. : Suero de Caballo**

**Ser : Proteasas Serinas**

**SFB : Suero Fetal de Bovino**

**SREBP : Proteínas asociadas a elementos reguladores del esterol**

**TNF : Factor de Necrosis Tumoral**

**TNFR : Receptor para el Factor de Necrosis Tumoral**

**TRADD : dominio de muerte asociada al receptro del TNF**

**TS : Timidilato Sintetasa**

**U1 RNP : Ribonucleoproteina U1**

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>1.-MARCO TEORICO</b>	
<b>1.1.-BIOLOGÍA DE LA HEMATOPOYÉISIS.</b>	3
<b>1.2.-ESTRUCTURA DEL COMPARTIMENTO HEMATAPOYÉTICO.</b>	5
<b>1.3.-SENESCENCIA CELULAR.</b>	9
<b>1.4.-PROCESOS DE MUERTE CELULAR.</b>	9
<b>1.4.1.-MUERTE CELULAR ACCIDENTAL O NECROSIS.</b>	10
<b>1.4.2.-MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS.</b>	11
<b>1.5.-PARTICIPACIÓN DE PROTEASAS EN LA APOPTOSIS.</b>	14
<b>1.5.1.-SUBSTRATOS DE LAS PROTEASAS.</b>	16
<b>1.6.-REGULACIÓN GENÉTICA EN LA APOPTOSIS.</b>	16
<b>1.7.-PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS MEMBRANALES EN EL     PROCESO DE LA APOPTOSIS.</b>	19
<b>1.8.-LAS DROGAS ANTICANCERÍGENAS COMO AGENTES     INDUCTORES DE LA APOPTOSIS.</b>	20
<b>1.9.-ENFERMEDADES ASOCIADAS A DEFECTOS EN LA     APOPTOSIS.</b>	21
<b>2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	22
<b>3.-HIPÓTESIS.</b>	23
<b>4.-OBJETIVOS GENERALES.</b>	24
<b>4.1.-OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	24
<b>5.-MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	25
<b>6.-RESULTADOS.</b>	31
<b>7.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	44
<b>8.-CONCLUSIONES.</b>	49
<b>9.-LITERATURA CITADA</b>	50

## RESUMEN

El proceso de la hematopoyesis o producción de células de la sangre, es regulada por una gran variedad de proteínas llamadas citocinas que se encuentran presentes en el microambiente hematopoyético. Dichas citocinas son sintetizadas por diversos tipos celulares, como por ejemplo: células epiteliales y fibroblastos, entre otros. En años recientes se ha observado que el proceso de la apoptosis también puede regular la hematopoyesis. La muerte celular por apoptosis es inducida mediante una gran cantidad de agentes químicos, entre los que se encuentran las drogas anticancerígenas.

En este trabajo, se demuestra que la droga anticancerígena 5-Fluorouracilo (5FU), induce la apoptosis en tres líneas celulares establecidas de diferentes linajes: la leucémica promielocítica humana HL60, la macrófaga P388 y la fibroblástica L929. Cuando se cultiva con 5FU la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración y el tiempo de cultivo. Las poblaciones iniciales decayeron a la mitad de su número entre las 48 y 72 horas a concentraciones menores de 120 ng/ml, las cuales fueron evaluadas por el método de exclusión con azul tripano. Además, se observó que a las 48 horas de cultivo con el 5FU, L929 sufre un 50 % de apoptosis, P388 un 75 % y HL60 un 67 % cuando se evaluaron por morfología apoptótica, condensación del ADN, y mediante la fragmentación del ADN, a través de la incorporación de timidina tritiada.

Los medios condicionados de las tres líneas celulares en presencia o ausencia de 5FU fueron colectados y se les evaluó su capacidad proliferativa sobre células de médula ósea mediante ensayos en líquido y formación de colonias. Se observó que ningún medio condicionado de HL60 en presencia o ausencia 5FU presentó actividad proliferativa mientras que los medios condicionados de L929 tanto en presencia como ausencia de 5FU presentaron actividad proliferativa en medio líquido, aumentando ésta en los medios condicionados obtenidos de P388 y L929 en presencia de 60 ng/ml con 5FU; y se corroboró por la capacidad de formar colonias en agar. Las colonias observadas por los medios condicionados de P388 y L929 en presencia o ausencia de 5FU pertenecen al linaje monocito-macrófago y granulocitos. Lo antes mencionado nos sugiere que las líneas

celulares son inducidas a la apoptosis por la adición del 5FU y como resultado, las células son capaces de incrementar la síntesis o liberación de citocina (s) al medio extracelular; por lo tanto, se discute un posible mecanismo donde la muerte celular por apoptosis pudiera regular la hematopoyésis a través de la síntesis o liberación de proteínas con capacidad hematopoyética proliferadora.

# 1.- MARCO TEÓRICO.

## 1.1.-BIOLOGÍA DE LA HEMATOPOYESIS.

Todas las células que forman los diferentes tejidos de un organismo, mueren continuamente, por lo que necesitan ser sustituidas por células nuevas, lo que es posible gracias a una estrecha relación entre los procesos celulares conocidos como proliferación, diferenciación y muerte celular los cuales son regulados por mecanismos genéticos y bioquímicos.

La hematopoyesis consiste de una serie de eventos que involucran la producción de las células maduras de la sangre a partir de unas células hematopoyéticas conocidas como células madre totipotenciales hematopoyéticas (CMTH del inglés Stem Cell Hematopoyetic) (Beck, W. 1991). Las CMTH en el adulto residen principalmente en el tejido blando conocido como la médula ósea, que se localiza en los huesos largos y planos tales como el fémur, las costillas, el esternón y las vértebras del humano y vertebrados superiores (Dexter, T.M. 1990).

Se estima que las CMTH representan sólo el 0.01-0.05% de la población total de células hematopoyéticas de la médula ósea (Müller-Sieburg, C.E. 1995) y las dos propiedades más importantes de las CMTH, son la capacidad de autorrenovación y la diferenciación; esto es, pueden originar a células idénticas a ellas mismas o madurar a los diferentes linajes celulares que componen el tejido sanguíneo: tanto células progenitoras hematopoyéticas (CPH del inglés Cell Progenitor Haemopoietic) como a las células de la sangre: eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y megacariocitos, las cuales pierden la capacidad de autorrenovarse (Mayani, H. 1997; Klein, G. 1995; López, K.X. 1995; Müller-Sieburg, C.E. et al. 1995).

El tejido hematopoyético es uno de los más importantes del cuerpo humano y en adultos normales la médula ósea es la fuente principal de maduración y proliferación de células hematopoyéticas; sin embargo, en la embriogénesis el primer sitio hematopoyético está en los islotes sanguíneos del saco vitelino, que aparecen en la cuarta semana después de la concepción (Rifkind, R.A. et al. 1988) y permanece como el sitio activo hematopoyético temporal hasta las semanas ocho y doce. Posteriormente, las células madre

del saco vitelino migran al hígado y es ahí donde comienza la formación de las células de la sangre (López, K.X. 1995). El hígado fetal se convierte y permanece como el principal sitio de hematopoyésis hasta el sexto mes de la gestación. Por su parte el bazo inicia su actividad hematopoyética un mes después que el hígado y generalmente termina al séptimo mes de la concepción. La hematopoyésis en la médula ósea comienza en el quinto mes de la gestación y a finales de éste, es la mayor fuente productora de las células de la sangre (Beck, W. 1991) y después de las tres primeras semanas de vida (postparto) en condiciones normales, la médula ósea se convierte en el único sitio activo de la hematopoyésis, permaneciendo así durante toda la infancia y la vida adulta (Rifkind, R.A. et al. 1988, López, K.X. 1995).

Las primeras evidencias sobre la existencia de las CMTH se dieron en 1961 cuando Till y McCulloch demostraron que ratones letalmente irradiados pueden ser rescatados de su muerte segura, si se les inyecta células recién obtenidas de la médula ósea de ratones normales. Los grupos celulares formados en el bazo de ratones irradiados contienen diferentes estirpes sanguíneas, contenidos en grupos o colonias. A las células hematopoyéticas capaces de formar colonias las definieron como células formadoras de bazo o CFU-S (por sus siglas en inglés Colony Forming Units of Spleen) por su capacidad de autorenovación y por su habilidad de originar a los linajes mieloide, eritroide y linfoide, es decir por su capacidad pluripotente de diferenciación (Rifkind, R.A. et al. 1988). Bajo condiciones *in vitro* (en un medio semi-sólido de agar) se ha observado que cuando se cultivan células hematopoyéticas de médula ósea purificadas con un estímulo apropiado como los factores de crecimiento (CSF's por sus siglas en inglés Colony Stimulating Factor) se forman diferentes tipos de colonias dependiendo del factor involucrado (Testa, N.G. and T.M. Dexter, 1990). Los CSF's son moléculas ó proteínas que pertenecen al grupo de la citocinas.

## **1.2.-ESTRUCTURA DEL COMPARTIMIENTO HEMATOPOYÉTICO.**

En el interior de un hueso completamente formado, la médula existe como un tejido conectivo flojo altamente vascularizado y enriquecido celularmente. Las células CMTH y CPH se encuentran en estrecha asociación con las células del estroma dentro del microambiente hematopoyético y los procesos normales de la hematopoyésis como son: proliferación, diferenciación, maduración, viabilidad y muerte celular, son regulados en gran parte por la interacción con los factores de crecimiento y también por las moléculas presentes en la matriz extracelular como las colagenas, proteoglicanos, fibronectinas, tenascinas, lamininas y la hemonectina (Metcalf, D. 1993; Long, M. 1992, Klein, G. 1995).

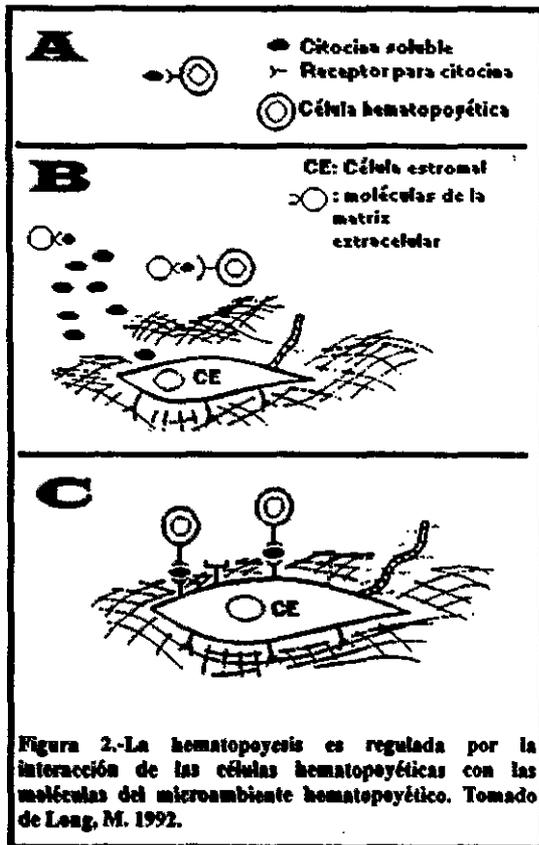
Las células hematopoyéticas pueden ser divididas en cuatro compartimentos celulares dependiendo de la madurez: a) células pluripotenciales primitivas; células multipotenciales; c) células precursoras comprometidas y d) células maduras, con funciones especializadas que disminuyen o pierden su capacidad de proliferar (ver figura 1).

El microambiente hematopoyético está conformado por cuatro componentes importantes: las células hematopoyéticas, un componente estromal altamente organizado que mantiene la proliferación y diferenciación de las células hemaopoyéticas; y una matriz extracelular que permite unir y presentar factores de crecimiento a las células hematopoyéticas. El estroma, permanece y funciona como base sobre la cual los progenitores pueden proliferar y diferenciarse (Muller-Sieburg, 1995). Esta conformado por células como los fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y osteoclastos. Todos estos tipos celulares se encargan de sintetizar y secretar varias citocinas como los CSF's, interferones e interleucinas al microambiente hematopoyético (Mayani, H. et al. 1992; Beck, W. 1991).



como los factores estimulantes de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Forming), granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés Granulocyte Colony Stimulating Forming), macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés Monocyte Colony Stimulating Forming), eritropoyetina (EPO, por sus siglas en inglés Eritropoietin), Interlucina-3 (IL-3, por sus siglas en inglés Interleukin-3) y el Factor Steel (SCF por sus siglas en inglés Steel Cell Factor) actúan primordialmente como estimuladores de la hematopoyésis; por su parte, citocinas como el Factor de Crecimiento Tumoral- $\beta$  (TGF $\beta$ , por sus siglas en inglés Transforming Growth Factor- $\beta$ ), el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ , por sus siglas en inglés Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), el Interferon- $\gamma$  (IFG $\gamma$  por sus siglas en inglés Interferon- $\gamma$ ) y la proteína inhibidora de macrófagos- $\alpha$  (MIP $\alpha$  por sus siglas en inglés Macrophage Inhibitor Protein- $\alpha$ ), actúan fundamentalmente como inhibidores de la hematopoyésis (Moore, M. 1991).

La gran mayoría de las citocinas actúan de manera parácrina, es decir, en radios de acción cortos (generalmente dentro del microambiente hematopoyético). Las citocinas se unen a las células CMTH y CPH de diversas formas. Por un lado, son secretadas por células del microambiente hematopoyético de manera soluble para ser tomadas por las célula hematopoyéticas o blanco; al parecer, este es el mecanismo más común (figura 2a).



(Flanagan, J. 1990)].

Recientemente, se han presentado evidencias que sugieren que las HSC/HPC pueden experimentar mecanismos autócrinos, es decir, que ellas mismas producen los factores hematopoyéticos que requieren (Watari, K. et al. 1996).

Todas las citocinas actúan sobre las células hematopoyéticas a través de la interacción directa con receptores específicos ubicados en la superficie celular (Olsson, L. et al. 1992). Dichos receptores son proteínas transmembranales con un dominio extracelular (que interacciona con la citocina o ligando), una porción que atraviesa la bicapa lipídica (transmembranal) y un dominio citoplásmico (intracelular).

Por otra parte, al ser secretadas, pueden unirse a las moléculas de la matriz extracelular y ser presentadas de esta forma a su célula blanco; este mecanismo ha sido descrito para algunas citocinas como el GM-CSF e IL-3 [figura 2b, (Gordon, 1987)]. Finalmente, una vez que son sintetizadas, las citocinas pueden no ser secretadas sino permanecer asociadas a la membrana plasmática de la célula productora; en este caso, la presentación a la célula blanco se hará cuando exista un contacto directo célula-célula; esto ocurre en el caso de los factores como el M-CSF y el factor Steel [figura 2c

### **1.3.-SENESCENCIA CELULAR.**

La homeostasis en los tejidos normales es mantenida por el balance entre el nacimiento de células nuevas y la muerte de las mismas, esto es, la sustitución de nuevas células por aquellas que alcanzan la senescencia celular. La senescencia celular se define como un número limitado de divisiones celulares a cuyo término se detiene la proliferación. Existen dos hipótesis sobre la senescencia celular, 1) el modelo del daño o catástrofe, propone una acumulación de daños o mutaciones en el ADN, ARN o proteínas que conduce a la pérdida de la capacidad proliferativa; 2) la senescencia es un proceso genéticamente programado. El escape de la senescencia celular es un importante paso para la progresión neoplásica de los tumores (Barret, J.C. 1993).

### **1.4.-PROCESOS DE MUERTE CELULAR.**

Existen dos procesos de muerte celular reconocidos por su naturaleza e importancia biológica: la *Necrosis* y la *Apoptosis*. La necrosis es un proceso pasivo que no requiere de un gasto de energía y produce una respuesta inflamatoria local (también se le denomina muerte celular accidental), mientras que la muerte celular programada o apoptosis, es un proceso activo e implica un gasto de energía, que no genera una respuesta inflamatoria local y algunas veces requiere de la síntesis de proteínas *de novo* (Earnshaw, A.C. 1995) (figura 3).

### 1.4.1.-MUERTE CELULAR ACCIDENTAL O NECROSIS.

La muerte celular por necrosis es una respuesta a cambios patológicos iniciados fuera de la célula y por una gran variedad de factores que afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática, generando un edema celular y eventualmente la lisis osmótica de la célula. En este proceso la célula tiene un papel pasivo en la iniciación del proceso de muerte. Algunos factores que la inducen son: los golpes físicos muy drásticos, niveles de estrés

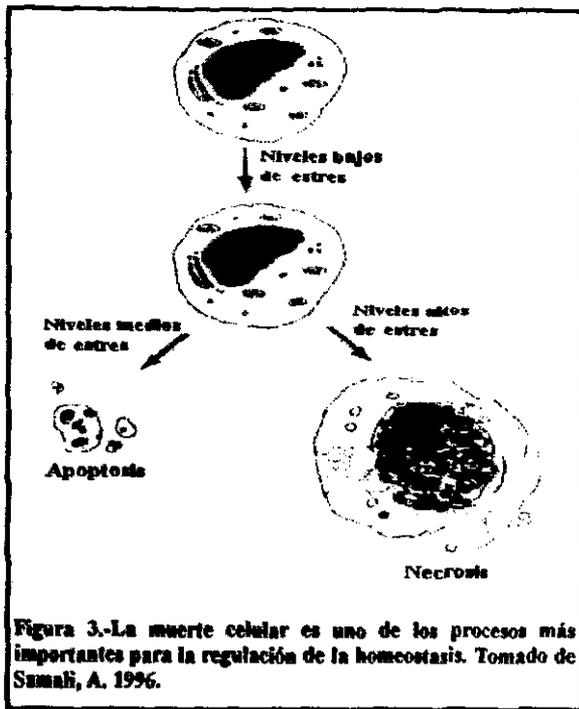


Figura 3.-La muerte celular es uno de los procesos más importantes para la regulación de la homeostasis. Tomado de Samah, A. 1996.

elevados, infecciones virales líticas, venenos, carencia de oxígeno e hipertemia (Cohen, J.J. 1993; Bowen and Sandra 1990).

Durante la necrosis, la célula sufre algunos cambios estructurales en los complejos del "poro" y las bombas de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . Así, los iones que en condiciones normales son bombeados hacia el interior de la célula, ahora son bombeados hacia el exterior. Estos cambios ocurridos generalmente son drásticos e irreversibles, por lo cual, la célula no los puede regular y se incrementa el volumen celular hasta que la membrana celular se rompe en pequeños fragmentos celulares. El contenido celular se libera al medio circundante o extracelular, causa daños a las células vecinas y se genera una respuesta inflamatoria local, lo cual contribuye al daño del tejido (Duke, R.C. 1997).

#### 1.4.2.-MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS.

La apoptosis o muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés, Programmed Cell Death) incluye cambios morfológicos y bioquímicos como lo son la contracción de la célula, la formación de burbujas o prolongaciones de la membrana citoplasmática, la condensación de la cromatina, la degradación del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales están rodeados por una membrana (Bowen, I.D. and M.B. Sandra 1990; Squier, M.K.T. 1994; Bortner, C.D. 1995; Tusha, P.G. 1996, Martins & Earnshaw, 1997) y son fagocitados por las células macrófagicas (Jacobson, M.D. 1997). Este proceso ocurre a un tiempo específico y por lo general durante el desarrollo embrionario del organismo, aunque también ocurre con frecuencia a lo largo de la vida del organismo (Samali, A. 1996).

En años recientes, se han establecido varios sistemas *in vitro* para el estudio de la apoptosis donde se utilizan células carentes de núcleo, en donde se ha demostrado que puede dividirse en dos fases denominadas: *de sentencia* y *de ejecución* (Earnshaw, W.C. 1995). En la primera, la célula recibe una señal externa o interna y se compromete a morir, se contrae ligeramente, (lo cual está asociado con un decremento en el núcleo y condensación de la cromatina), la membrana citoplasmática pierde sus microvelocidades y disminuye el volumen celular (Montague, J.W. 1996). A esta fase se le conoce también como temprana o latente. En la fase de ejecución o activa, ocurre la degradación nuclear y de los componentes citoplásmicos; estos cambios se llevan entre 15 minutos y 1 hora (Earnshaw, W.C. 1995; Lazebnik, Y.A. 1995; Earnshaw, W.C. 1995).

La apoptosis bajo condiciones fisiológicas normales tiende a ser programada, mientras que en condiciones *in vitro* puede ser inducida en diferentes tipos celulares por agentes endógenos (generalmente, hormonas) o bien por tratamientos exógenos como irradiaciones- $\gamma$  (Chen, Y.R., Meyer, C.F. and T. Tse-Hua), agentes químicos, virus y carencia de un factor de sobrevivencia específico (Tabla 1).

**Tabla 1.-Diferentes agentes inductores de la apoptosis en líneas celulares establecidas.**

<b>AGENTE INDUCTOR</b>	<b>CELULA BLANCO</b>
corticoides	hepatocitos
glucocorticoides, etopósido	timocitos
interferón-γ	células leucémicas B
óxido nítrico	macrófagos RAW, células-B, timocitos, condrocitos
ligando CD-95 (APO/FAS-1)	células T humanas leucémicas Jurkat
ligando CD-40	células dendríticas
calcio ionóforo A23187	células Jurkat, células B (linfoma), diversos tipos celulares
ligando para Apo-2, TNF	células T humanas leucémicas jurkat
deprivación de IL-3	líneas hematopoyéticas FDC-P2/185-4
esteres de forbol, rayos γ y UV	células leucémicas HL60, Jurkat y timocitos
deprivación de suero	células CHO, Rat-1
menadiona	fibroblastos Rat-1
lecitina PHA	células T humanas leucémicas jurkat
actinosporina	células SKW6.4
LPS + ATP extracelular	macrófagos de exudado peritoneal
ciclohexanida + TNFα	células leucémicas HL60, HeLa
5-fluorouracilo	células de intestino delgado y colon
etopósido, puromicina, tributina	células U937
Coranida	línea linfoblástica humana CEM

La apoptosis involucra diferentes alteraciones morfológicas que además de involucrar a la membrana celular, también relaciona cambios estructurales en el citoesqueleto, los microtúbulos y microfilamentos. Uno de los eventos tempranos de la apoptosis observados en la membrana citoplasmática es la formación de prolongaciones de membrana ("zeiosis"), dando la apariencia de una célula hirviendo (formación de burbujas) (Cohen, J.J. 1993).

La contracción de la célula o pérdida de volumen se debe a las alteraciones del retículo endoplásmico, éste forma pequeñas vesículas que migran y se fusionan con la membrana citoplasmática, liberando su contenido en la región extracelular (Bowen, and Sandra, 1990). La energía (adenosina trifosfato o ATP) necesaria la proporciona la mitocondria que permanece estructuralmente intacta durante el proceso (Samali, A. 1996). El agua se mueve contra el gradiente osmótico y el volumen celular se reduce alrededor del 30-50%. Los cambios en la cromatina están acompañados por dos cambios en la envoltura

nuclear 1) la redistribución los poros nucleares y 2) el desensamble de la lámina nuclear debido a su proteólisis (Ghibelli, L. 1995; Earnshaw, W.C. 1995).

Se ha demostrado que durante la apoptosis ocurre la fragmentación del ADN en trozos de aproximadamente 180-200 pares de bases (pb), aunque también se ha observado que la apoptosis no siempre implica la fragmentación del ADN. Se han descrito tres tipos diferentes de fragmentación del ADN, los cuales pueden distinguirse claramente: 1) la fragmentación internucleosomal del ADN (180-200 pb); 2) la fragmentación de porciones más grandes que oscilan entre 50-300 kpb; y 3) la separación de la doble cadena del ADN en dos cadenas sencillas. Varios investigadores han propuesto que los fragmentos de 50-300 kpb son los precursores de la fragmentos de 180-200 pb, sin embargo, se ha demostrado que los fragmentos largos de ADN no siempre son los precursores de la fragmentación internucleosomal. La fragmentación del ADN en dos cadenas sencillas también se ha observado en la línea celular HL60 inducida a la apoptosis con campotecina (inhibe la topoisomerasa I e induce apoptosis), sin embargo, estas cadenas sencillas del ADN tienen elevados niveles de organización por lo que no desempeñan una función importante activa durante la apoptosis aunque pueden activar otras señales que la induzcan (Bortner, C.D. et al. 1995; Montague, J.W. and J.A. Cidlowski 1996). La presencia de diferentes tipos de fragmentaciones del ADN ha llevado a la hipótesis de que existen una o más enzimas involucradas en la apoptosis. Hasta la fecha, la fragmentación del ADN es un excelente marcador de la apoptosis y aún más si se correlaciona con los eventos morfológicos de la muerte celular (Hale, J.A. 1996).

Una parte crítica de la apoptosis es el reconocimiento específico y la remoción de los cuerpos apoptóticos por células profesionales o macrófagos, aunque otros autores indican que las células epiteliales tienen también dicha capacidad, por lo cual han sido nombradas células semi-profesionales. El reconocimiento por los macrófagos se hace por medio de los cambios que sufre la célula apoptótica en su membrana citoplasmática, como la alteración de los azúcares y lípidos de la membrana, los cuales se unen preferencialmente a los macrófagos. En células de mamíferos el reconocimiento de las

células apoptóticas por los macrófagos puede ser mediado por los receptores de la vitronectina  $\alpha_v\beta_3$  (CD36) y la trombospodina (Hale, J.A. et al. 1996). Otro cambio importante en las células apoptóticas es la pérdida de la asimetría fosfolipídica; normalmente, la fosfatidilserina se localiza en la membrana interna, mientras que los fosfolípidos neutrales como la fosfatidilcolina y la esfingomiélin se encuentran en la membrana externa. Se ha observado que durante la apoptosis la fosfatidilserina se encuentra en la parte externa de la membrana y contribuye al reconocimiento por parte de los macrófagos para su fagocitosis (Samali, A. 1996; Hale, J.S. et al. 1996).

### **1.5.-PARTICIPACIÓN DE PROTEASAS EN LA APOPTOSIS.**

La células normales presentan en su citosol muchas proteínas inmaduras, las cuales se encuentran como pro-enzimas, cuando existe una señal apoptótica el prodominio de dichas enzimas es liberado y se generan enzimas maduras, denominadas proteasas (Jacobson, M.D. 1997). Se ha observado que los cambios morfológicos y estructurales durante la apoptosis generalmente se deben a la activación de dichas enzimas, las cuales se encargan de fragmentar o degradar a los diferentes sustratos u organelos celulares y activar a otras proteínas. Actualmente se han descrito dos tipos de proteasas involucradas en el proceso de la apoptosis: las proteasas serinas (Ser) y las proteasas cisteínas (Cis).

Las proteasas serinas se presentan en las células efectoras citotóxicas, donde se incluyen a los linfocitos T citotóxicos (CTL; por sus siglas en inglés Cytotoxic T Lymphocyte), células naturales asesinas (NK; por sus siglas en inglés Natural Killer) y a las células asesinas activadas por linfocinas (LAK; por sus siglas en inglés Lymphokine Activating Killer). La apoptosis de la célula blanco puede ocurrir por la unión de su receptor Fas (FasR) presente en la superficie al ligando Fas o por la liberación de los gránulos celulares efectoras. Los gránulos celulares contienen perforinas (proteínas formadoras de poros) y granzimas B, las cuales inducen la fragmentación del ADN.

Recientemente, se observó que las granzimas B son capaces de activar a las proteasas cisteinas (Ghibelli, L. 1995; Tusha P.G. et al. 1996).

Las proteasas cisteinas ahora también denominadas "Caspasas", están conformadas por la familia de la enzima convertidora de interleucina-1 $\beta$  (ICE, por sus siglas en inglés Enzyme Converting Interleukin-1 $\beta$ ). En esta familia se incluye la propia ICE y otras proteasas similares a ICE conocidas como Ich-1/Nedd-2; Ich-2/TX/ICE<sub>rel</sub>II; ICE<sub>rel</sub> III; Mch2; prICE/PPP32/apopain/YAMA; Mch3/ICE-LAP3/CMH-1 (An and Knox, 1996), ICE/LAP6; Mch4/FLICE; ICH3 y FLICE/MACH (Muzio, M. et al. 1997). La sobreexpresión de cada una de estas proteasas inducen la apoptosis a diferentes tipos celulares (Slater, A.F.G. et al. 1995).

Las proteasas ICE fueron identificadas por vez primera en el citosol de monocitos y en líneas celulares semejantes a monocitos, tienen un aminoácido Cys<sup>285</sup> como sitio activo, el cual se encuentra en la región conservada QACRG (Tushar, P. G. et al 1996; An, S., and K.A. Knox 1996; Whyte, M. 1996), tienen mucha afinidad por las uniones específicas entre la asparagina ó ácido aspártico (Asp)<sup>116</sup> y la alanina (Ala)<sup>117</sup> en la posición P1 (Kondo, S. et al. 1996) y tienen la capacidad de fragmentar el precursor inactivo de la IL-1 $\beta$  de 31 kilodaltones (kDa), la prointerleucina-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) en el sitio carboxilo de Asp para generar la citocina IL-1 $\beta$  de 17.5 kDa biológicamente activa (Jung, Y.K., Miura, M. and J. Yuan 1996; Kondo, S. et al. 1996).

Las proteasas posiblemente se activan en cascada o por jerarquía (Kumar, S and L. Harvey 1995; Jacobson, M.D. et al. 1997) como se ha observado en diferentes sistemas, por ejemplo: las granzimas B activan a las proteasas CPP32, quienes se encargan de activar a otras proteasas (Zhivotovsky, B.,1996), las cuales a su vez se encargan de fragmentar a su substrato PARP (ver más adelante. An, S. and K.A. Knox. 1996).



apoptosis, de esta forma, *ced-9* regula la expresión y/o activación de *Ced-3* y *Ced-4* (Tusha, P.G. 1996; Jacobson, M.D. et al. 1997). Se han identificado dos proteínas homólogas a *C. elegans* en mamíferos, la proteína *Ced-9* es homóloga a la proteína *Bcl-2* (23 % de identidad) y la proteína del gene *Ced-3* es homóloga a la enzima de mamífero *ICE* (29 % de identidad), aunque aún no se ha identificado una proteína homóloga de *Ced-4* en mamíferos (Wu, D.1997).

La familia *Bcl-2*, está formada por genes que inhiben la apoptosis como *Bcl-x<sub>L</sub>*, *MCL-1* y *Bcl-2*, y otros que la aceleran como *bax*, *Bcl-x<sub>s</sub>*, y *Bad* (McDonnell, et al. 1996; Jacobson, 1997; Minn, A.J. et al. 1997). Los primeros genes tienen la capacidad de inhibir la activación de las proteasas semejantes a ICE tal como sucede con el gene *Ced-9* en *C. elegans* (Wu, D., Wallen, H.D. and G. Nuñez 1997). Todos los miembros de esta familia conservan los dominios BH1 y BH2, los cuales tienen un papel importante en la supresión de la apoptosis (Slater, A.F.G. et al. 1995). Los mecanismos moleculares por los cuales *Bcl-2* inhibe la apoptosis son poco conocidos, sin embargo, se ha observado que *Bcl-2* actúa como un agente antioxidante (Richter, C. et al. 1996), contribuye a la sobrevivencia y disminución de la proliferación celular debido a la prolongación de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Borner, C. 1996) y el más descrito es en gran parte por interacciones proteína-proteína donde la susceptibilidad a la apoptosis está determinada por dimerizaciones entre dos miembros de la familia *bcl-2* o entre un miembro de la familia *bcl-2* y otra proteína distinta (McDonnell, T.J. et al. 1996) como por ejemplo: la proteína BAG-1 (Takayama, S. et al. 1980) ó *Bad* (Yang, E. et al. 1997). Por lo tanto, al parecer la apoptosis se lleva a cabo o no por la competencia en la formación de dimerizaciones dependiendo de que proteínas de la familia *Bcl-2* interactúen con ellas mismas o con otras proteínas (Yang, E. et al. 1997).

Cuando el oncogene *c-myc* se encuentra sobreexpresado o mutado, una célula tiene dos vías opcionales 1) muere por apoptosis, o 2) tiende a proliferar en forma descontrolada. Cuando sigue la vía apoptótica se ha demostrado que *c-myc* actúa en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular a través de la activación de las proteasas semejantes a la ICE y puede ser bloqueada

por el gene *Bcl-2* y/o mediante la adición de citocinas específicas, como el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) (Desbarats, L. et al. 1996; Jung, Y.K. et al. 1996); sin embargo, existen muchos mecanismos desconocidos de apoptosis que son independientes de la expresión de *c-myc* (Ruiz, R.M.C. et al. 1995). Aunque, la decisión de proliferar o morir vía apoptosis por la sobreexpresión de *c-myc* depende en gran parte de la presencia o ausencia de los factores de sobrevivencia extracelulares (Desbarats, L. et al. 1996).

El gene *P53*, el cual se ha observado es un supresor de tumor, tiene dos funciones muy importantes e independientes 1) detener la fase G1 del ciclo celular y 2) inducir la apoptosis. En la mitad de los tumores humanos la proteína *P53* se encuentra mutada e inactiva jugando un papel muy importante en la tumorigénesis debido a que las células no mueren por apoptosis. La proteína *P53* tiene como función reparar los daños ocurridos al ADN y aumentar la estabilidad genómica (Yonish-Rouach, E. 1996). En este tiempo la célula puede reparar este daño al ADN, pero si el daño es irreparable, *P53* induce la apoptosis (Samali, A. 1996).

Otro gene implicado en la apoptosis es *c-fos*, cuyo producto tiende a formar heterodímeros con los miembros de la familia Jun para regular la proliferación, la diferenciación o la apoptosis. Se ha encontrado que *c-fos* está involucrado en la progresión de la apoptosis, sin embargo, al parecer no juega un papel muy importante ni decisivo en dicho proceso (Gajate, C., et al. 1996).

Como ya hemos mencionado, la apoptosis involucra la sobreexpresión de ciertos genes y la supresión de otros (Lin, X S., et al. 1995), encontrándose que dicha sobreexpresión se correlaciona a su vez con cambios en los porcentajes de la expresión de *c-myc*, *p53* y *bcl-2* en diferentes tipos celulares. Se ha observado que en las células apoptóticas existen altos niveles del ARNm de los genes *c-myc* y *p53* y de forma contraria, una baja expresión del ARNm para *bcl-2* (Handa, A. 1996; Handa, A., et al. 1997). También se ha observado que las células de colon e intestino delgado inducidas a la apoptosis por el 5FU sobreexpresan la proteína *p53* posiblemente mutada; mientras que el

protooncogene *bcl-2* protege a las células de la apoptosis inducida por la adición de la droga citotóxica 5-fluorodeoxiuridina (Fisher, et al. 1993) y se encontró también sobreexpresado el oncogene *c-myc* (Murakami, T. et al. 1995).

Se ha observado que diferentes virus de mamífero tienen la capacidad de llevar consigo secuencias que codifican para proteínas semejantes a los genes *ced-9/bcl-2* e inhibir el proceso de apoptosis tales como: el gene del virus Epstein-Barr (*BHRF1*), el virus del fever swine Africano (*ASFV*) y el gene *LMWS-HL* o también conocido como *A179L* y el marco de lectura abierta del gene del virus herpes (*ORF16*) (Hale, J.A. et al. 1996).

### **1.7.-PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS MEMBRANALES EN EL PROCESO DE LA APOPTOSIS.**

Una célula tiende a sufrir el proceso de apoptosis por las señales del medio ambiente que la rodea, las cuales son transmitidas a las señales internas de la célula dependiendo del tipo celular, el estado de maduración y su desarrollo. Las condiciones microambientales pueden conducir a la apoptosis, como por ejemplo: la aparición o desaparición de hormonas, la presencia de ciertas citocinas o un cambio directo en las interacciones intercelulares. En particular un estímulo externo es sólo una parte de la información que afecta la decisión entre la autodestrucción y la sobrevivencia, tal estímulo puede no ser exclusivo de la apoptosis. De forma similar las señales intercelulares de la apoptosis están a menudo involucradas en otros procesos como es la proliferación ó la diferenciación en otros contextos celulares.

Actualmente se han caracterizado dos receptores de superficie celular para citocinas involucrados en el proceso de la apoptosis: el antígeno Fas/APO-1 (CD95) y el receptor para el factor de necrosis tumoral tipo I (del inglés; Tumoral Necrosis Factor Receptor I o TNFRI). Se ha observado que cuando estos receptores se unen con su ligando natural por ejemplo: Apo-2 (Pitti, R.M. 1996) o algún anticuerpo específico, se induce la apoptosis

(Chinnaiyan, A.M. et al. 1995). Estos receptores se caracterizan por tener regiones altamente conservadas en la región citoplasmática llamados "dominios de muerte" (Brunner, T. et al. 1995; Ju, S.T. et al. 1995). Estos dominios de muerte tienden a formar complejos con las moléculas acompañantes: FADD (Chinnaiyan, A.M. et al. 1995), TRADD (Hsu, H. et al. 1995), RIP (Stanger, B.Z. et al. 1995), RAIDD (Duan, H. and V.M. Dixit 1997) y FLICE (Muzio, M. 1997), las cuales desempeñan un papel muy importante durante la inducción de la apoptosis en la mayoría de las células linfoides.

### **1.8.1.-LAS DROGAS ANTICANCERÍGENAS COMO AGENTES INDUCTORES DE LA APOPTOSIS.**

Las drogas anticancerígenas son un grupo de agentes químicos que dependiendo de diferentes factores como la concentración, la susceptibilidad de la línea celular a la droga, el tiempo de cultivo, el ciclo celular y la fase en la que actúa preferentemente la droga, son capaces de inducir apoptosis (Murakami, T. et al. 1995; Hickman, J.A. 1992; Prihchard, D.M. et al. 1997).

La adición de drogas anticancerígenas induce a los cultivos celulares a la apoptosis, por la incorporación de estas drogas. El 5-fluorouracilo (5FU) es un antimetabolito que involucra la participación de la enzima timidina sintetasa (TS), cuando se une al ácido fólico en su forma reducida inhibe la adición de nucleótidos timina a la cadena del ADN alterando la estabilización de la doble cadena del ADN (Prihchard, D.M. et al. 1997).

Se ha demostrado que algunas líneas celulares tienen una elevada resistencia a un agente tóxico ó a niveles citotóxicos de varios agentes letales. Sin embargo, la mayoría de los agente tóxicos son capaces de inducir la apoptosis; por lo tanto, la resistencia a los agentes citotóxicos es vista como una respuesta adaptativa a la apoptosis. Esta respuesta adaptativa al parecer es controlada a nivel genético y tiene una gran similitud con los mecanismos de resistencia a las drogas o termotolerancia. Uno de estos mecanismos, es a través de un incremento del glutatión GSH que le confiere a las células resistencia a las drogas citotóxicas. Existen muchas células que son multiresistentes o resistentes a varios

tipos de drogas, lo cual se debe a la sobreexpresión del gene *mdr*, el cual codifica para la glucoproteína-P (P-gp)(Samali, A. 1996).

### **1.9.-ENFERMEDADES ASOCIADAS A DEFECTOS EN LA APOPTOSIS.**

Muchas enfermedades están asociadas a una desregulación de la apoptosis, observándose una inducción inapropiada o supresión de la misma. Un incremento en los porcentajes de la apoptosis contribuye a las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. También juega un papel muy importante en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), donde la apoptosis es responsable de la eliminación de los linfocitos T.

La supresión de la apoptosis puede conducir a una situación de enfermedad. En muchos cánceres, la alteración en la expresión de algunos genes incrementa la longevidad de las células. En el linfoma folicular, por ejemplo: la sobreexpresión del gene *bcl-2* inhibe la apoptosis. En forma similar, en leucemias mieloides crónicas, las células mieloides presentan la forma activada del gene *c-abl* nombrado *bcr-abl*, debido a una traslocación en el cromosoma 18 y por lo tanto son resistentes a morir por apoptosis. Las enfermedades autoinmnes son el resultado de la inhibición de la apoptosis, incrementándose la persistencia de las células autorreactivas B y T.

## **2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Por un lado se ha observado que la apoptosis, es inducida por la gran mayoría de los agentes químicos, de los cuales ya se han descrito algunos mecanismos de acción; sin embargo, se desconoce si el 5FU induce también la muerte celular programada en diferentes líneas celulares *in vitro*.

Por otro lado habría de preguntarse el por que, una célula que muere por la vía celular programada implica un gasto de energía, si esta muere finalmente. Entonces, pudiera ser que esta célula secrete alguna citocina para explicar el gasto energético.

Algunos estudios han revelado que ciertos tipos celulares cuando son inducidos a la apoptosis son capaces de fragmentar el precursor de la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y dar origen a la IL-1 $\beta$  madura (Hoquist, K. et al. 1991; Miura, M. et al. 1995); Más recientemente se demostró que en pacientes que sufren del síndrome mielodisplásico en la médula ósea, presentan grandes cantidades de factores inhibidores de la proliferación como son el IFN $\gamma$  y TNF $\beta$ . En los mismos pacientes se observo pequeñas cantidades de factores activadores de la hematopoyesis como el GM-CSF (Shetty, V. et al. 1996).

Entonces el presente trabajo ayudaría 1) saber si la droga 5FU induce muerte celular programada o apoptótica; y 2) tratar de explicar, el por que las células inducidas a la apoptosis son capaces de sintetizar y/o secretar alguna citocina (s) que participan en la diferenciación y proliferación celular, que son de gran importancia para las funciones especializadas de los tipos celulares que constituyen al organismo y permitan la subsistencia del mismo, para tener un panorama mucho más amplio del o los mecanismos que sucede (n) en un organismo y contribuir a su entendimiento.

### **3.-HIPÓTESIS.**

Es sabido que ciertas drogas anticancerígenas tienen la capacidad de inducir apoptosis, entre ellas se encuentra al 5-Fluorouacilo (5FU), una droga ampliamente utilizada en padecimientos oncológicos. Por otro lado es conocido que la mayoría de las células hematopoyéticas indiferenciadas son activadas a la proliferación o diferenciación a través de citocinas, mediante un proceso regulado por interacciones celulares o sus productos. Por otra parte, como un mecanismo de renovación las células maduras hematopoyéticas entran en senescencia y mueren por apoptosis, siendo reemplazadas para mantener la homeostasis por nuevas células. Suponemos en consecuencia que si se usa 5FU como una sustancia inductora de apoptosis se deberá activar la sustitución de las células muertas para mantener la homeostasis. Por otro lado se esperaría que las células que entran en apoptosis envíen una señal para su sustitución mediante la secreción de citocinas. Dichas citocinas entonces promoverían la proliferación y diferenciación de células que sustituyan a las muertas.

#### **4.-OBJETIVOS GENERALES.**

**Determinar si el 5-fluorouracilo (5FU) es capaz de inducir apoptosis en las líneas celulares P388, L929 y HL60.**

**Determinar si las líneas celulares P388, L929 y HL60 producen, liberan o sintetizan alguna(s) citocina (s) al ser tratadas con la droga.**

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

**Determinar la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de 5FU para cada línea celular.**

**Determinar si el 5FU induce cambios morfológicos en las líneas celulares**

**Determinar si el 5FU es capaz de inducir la fragmentación del ADN.**

**Observar si los medios condicionados de las líneas celulares con 5FU tienen alguna actividad biológica en la proliferación de células de médula ósea.**

**Establecer la presencia de M-CSF en los medios condicionados de las células tratadas con 5FU.**

## **5.-MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **a).-Material Biológico.**

Se utilizaron tres líneas celulares establecidas: HL60, una línea leucémica humana en suspensión promielocítica y dos líneas de ratón, la línea P388 macrofágica y la fibroblástica L929. Las líneas celulares P388 y L929 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, USA) y la HL60 en medio modificado Dulbecco's Iscove's (MMDI) (Gibco, BRL USA) ambos suplementados con suero fetal de bovino inactivado a 56°C por 30 min. (SFB) [HyClone] al 10 % v/v, humedad saturante y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para los ensayos de actividad biológica en la formación de colonias en agar y en medio en líquido se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-1 de 2 meses de edad. Todos los ensayos se realizaron por separado e independientes por triplicado, se les calculó la media y desviación estándar por ensayo.

### **b).-Determinación de la Dosis-respuesta a Diferentes Concentraciones de 5FU, Tiempos de Cultivo e Inducción de Apoptosis.**

Las líneas celulares en fase exponencial se cosecharon y se sembraron en placas de 24 pozos (Nunc, USA) a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pozo en medio RPMI o Iscove, SFB al 10 % y en presencia o ausencia de 5FU (Sigma Chemical Co. USA); las concentraciones que se utilizaron fueron, 10, 60, 120, 200 y 400 nanogramos/ml (ng/ml). La relación de células vivas o muertas se evaluó a las 48 horas por la técnica de exclusión de azul tripano con la ayuda de una cámara de Neubauer (Boeckel Co, Germany) en un microscopio óptico usando el objetivo de 10 X (American Optical, USA).

Para la inducción de la apoptosis se sembraron  $5 \times 10^6$  células/caja petri de 4.5 centímetros (cm) de diámetro (Pyrex, USA) con y sin 5FU (60 ng/ml).

#### **c).-Evaluación de la Apoptosis Mediante Tinción con Giemsa y Yoduro de Propidio.**

Para evaluar si nuestras líneas celulares sufrían apoptosis en presencia del 5FU, se evaluó la condensación del ADN con yoduro de propidio, el cual se incorpora (intercala) específicamente a la doble cadena del ADN, o bien por tinción simple con giemsa, un colorante básico que es muy afín al ADN. Brevemente, las células se adherieron sobre un portaobjeto contenido en cajas petri, en medio de cultivo suplementado con SFB al 10 % toda la noche. Posteriormente, se les hizo un cambio de medio sin 5FU o con 5FU (60 ng/ml). Las evaluaciones se realizaron en intervalos de 24 horas. Cumplido el tiempo de cultivo necesario, los portaobjetos se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1 X y se fijaron al portaobjetos con glutaraldehído al 1.1% por 10 minutos y se lavaron nuevamente dos veces con PBS 1 X. Posteriormente, se permeabilizaron con metanol o acetona fría por 10-15 minutos (aproximadamente -20°) y se lavaron dos veces con PBS 1 X. Las células adheridas y permeabilizadas se tificaron con giemsa o en su caso con yoduro de propidio (1 mg/ml) por 15 y 2 minutos respectivamente; se lavaron con PBS o agua destilada en agitación continua por 5-10 minutos y se evaluaron en el microscopio de fluorescencia con luz visible ó luz ultravioleta en el objetivo seco fuerte de 100 X (Olympus B071, Japan).

#### **d).-Evaluación Cuantitativa de la Apoptosis Mediante la Incorporación de Timidina Tritiada.**

Otra técnica que se empleó para la evaluación de la apoptosis fue por medio de la incorporación de timidina marcada con el radioisotopo tritio. El ADN de las células en apoptosis es degradado en pequeños fragmentos, los cuales pasan a través de los filtros de papel cosechador y la radioactividad medida corresponde al ADN intacto (Matzinger, P. 1991). Para la línea en suspensión, las células en fase exponencial se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en medio MMDI suplementado con 10 % de SFB en una caja petri de 1 ml, bajo condiciones de esterilidad y se marcaron con 3  $\mu$ l de timidina tritiada ( $^3$ H)T (5 $\mu$ Ci) toda la noche (12 horas). Posteriormente, se lavaron y centrifugaron dos veces a 330 g con 2 ml de medio RPMI ó PBS; el botón celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de

medio y se pasó a dos tubos cónicos 100 µl en cada uno. A un tubo, con células marcadas se le agregó 4ml de medio RPMI más SFB al 10% (control) y al otro tubo se le agregó medio RPMI, SFB al 10 % y 60 ng/ml de 5FU. Se sembraron en placas de 96 pozos 50,000 células/pozo en alícuotas de 200 µl. En condiciones no estériles, las células fueron cosechadas a los tiempos determinados con una cosechadora (BRANDEL, USA), 0, 24, 48 y 72 horas. Al tiempo 0 (control) se cosecharon 5 pozos y posteriormente cada 24 horas. Las membranas se dejaron secar por 1 hora al aire libre y cada membrana se puso en un vial con 5ml líquido de centelleo (Ready Safe, Liquid Scintillation Cocktail) y se leyeron en el lector de centelleo (Beckman LS 6500, USA) en cuentas por minuto (cpm). Para las células adherentes se siguió un procedimiento similar: las células en fase exponencial se sembraron a una densidad de 20,000 células/pozo 12 horas para que se adherieran y posteriormente se marcaron con [<sup>3</sup>H]T.

Las cuentas por minuto son sustituidas en la fórmula según Matzinger (1991):  
% de citotoxicidad =  $\frac{\text{cpm Totales (no tratadas con 5FU)} - \text{cpm Experimental (tratadas con 5FU)}}{\text{cpm Totales (control sin 5FU)}} \times 100$

#### **e).-Eliminación del 5FU y Concentración de los Medios Condicionados.**

El 5FU en los medios condicionados obtenidos de nuestras líneas celulares interfería en los ensayos de actividad biológica, impidiendo la proliferación de las células hematopoyéticas e induciendo toxicidad, por lo que fue eliminado de los medios condicionados obtenidos. Los medios condicionados obtenidos de las líneas en condiciones normales de cultivo o en presencia de 5FU, se concentraron (30-50 veces) utilizando un SpeedVac (Automatic Environmental, AES200, Savant) y posteriormente se dializaron en membranas de corte de aproximadamente 3.5-5 kDa (Spectrum cellulose Ester, Sigma USA) por 72 horas, a 4°C en PBS diluido en agua destilada (relación 1:4) con cambios continuos cada 24 horas para la eliminación del 5FU y sales. Cada medio condicionado se utilizó para la formación de colonias y la evaluación de la proliferación en cultivos de médula ósea en líquido.

#### **f).-Evaluación de la Proliferación por la Técnica Colorimétrica del MTT.**

Esta técnica consiste en medir la actividad de la mitocondria a través de la reducción del MTT a formazan, de esta forma la densidad óptica (D.O.) es directamente proporcional a la proliferación celular. En una placa de 96 pozos se sembraron  $1 \times 10^5$  células/pozo de médula ósea en MMDI al 20% de SFB y se cultivaron en presencia de los diferentes medios condicionados (10%) previamente dializados y se evaluó a las 72 horas. La placa se centrifugó por 10 minutos a 267 g eliminando el sobrenadante y se lavó con PBS, cuidando de no perder las células y a cada pozo se le adicionó 30  $\mu$ l (2mg/ml) de MTT (3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) diluido en PBS 1 X y se mantuvo en cultivo por 3-4 horas. Después, la placa se centrifugó a 267 g por 10 minutos y se lavó con PBS 1X. Finalmente a cada uno de los pozos se les agregó 50  $\mu$ l de alcohol isopropílico (ácido) por 5 minutos en agitación y la placa se evaluó a 570 nanómetros (nm) con un fondo de 630 nm en el lector de ELISA (ELx800, Bio-Tek).

#### **g).-Obtención de Médula Ósea.**

Se sacrificaron ratones CD-1 por dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los fémures, en una caja Petri con medio RPMI (Sigma, USA). A los fémures se le perforaron ambas epífisis y con la ayuda de una jeringa de 1 ml se hizo fluir medio RPMI de un extremo a otro para la extracción de todas las células de la médula ósea, colocándose la suspensión en tubos cónicos para posteriormente ser centrifugados y lavados con RPMI a 330 g por 5 minutos. Para la obtención de células precursoras o totipotenciales, se utilizó un gradiente de densidad de 1.077 (Ficol Hystopaque-Sigma), colocándose 1 ml de éste y en seguida 2 ml de RPMI conteniendo las células previamente lavadas, se centrifugaron a 330 g durante 15-20 minutos. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo celular con la ayuda de una cámara de Neubauer (Boeckel Co, Germany) en el microscopio de luz visible.

**h).-Formación de Colonias de Médula Ósea por Bicapa en Agar.**

En placas de 24 pozos (Costar, USA) se sembraron  $1 \times 10^5$  células precursoras/pozo. La primera capa estuvo constituida por 20 % de suero de caballo (S.C. de GIBCO), 20 % de agar al 6 %, 20 % de RPMI 2 X, 20 % de RPMI 1 X y 20 % de los medios condicionados obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo en un volumen total de 1 ml. La segunda capa estuvo constituida por 20 % de S.C., 20 % de RPMI, 20 % de agar 3 X, 20 % de RPMI 1 X con  $1 \times 10^5$  células/pozo a un volumen total de 0.5 ml/pozo. Como control positivo se utilizó el factor estimulante de granulocitos-monocitos recombinante de ratón (rmGM-CSF) o medios condicionado de pulmón, a una concentración de 5 ng/pozo (10  $\mu$ l diluido 1:1000) o 20 % respectivamente. Se evaluaron las colonias por conteo en el microscopio invertido en el objetivo de 10 X y se contó como colonia todos aquellos grupos que tuvieran un número mayor de 20 células.

**i).-Obtención de Medio Condicionado de Pulmón.**

Los ratones CD-1 se inyectaron en la vena caudal con 1 ml de lipopolisacárido (LPS). Después de cuatro horas se obtuvieron los pulmones, los cuales se cultivaron por tres días en 7 ml de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10 % en tubos de vidrio. Los medios obtenidos se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22 micras y se les evaluó actividad biológica por la capacidad de formar colonias y ensayos de proliferación en medio líquido.

**j).-Detección del M-CSF en los Medios Condicionados Obtenidos de los Cultivos en Presencia o Ausencia de 5FU Mediante Ensayos de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).**

Las inmunoplaacas (Costar, USA) se estabilizaron con 100  $\mu$ l/pozo de medio condicionado o bien con 50, 25 o 12 ng/ml de la citocina recombinante murina M-CSF, diluida en amortiguador de carbonatos pH 9.5; se incubó por 2 horas a 37 °C y posteriormente toda la noche a 4 °C. La placa se lavó 4 veces con PBS-TWEEN (0.1 %) y

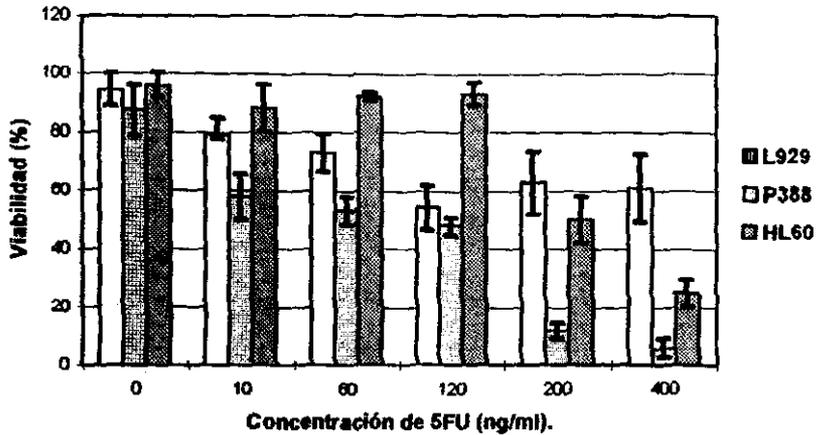
se bloqueó con 100  $\mu$ l/pozo de PBS-albumina al 0.25 % - TWEEN al 0.1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvió a lavar la placa 4 veces con PBS-TWEEN (0.1 %) y se les adicionó 100  $\mu$ l/pozo del primer anticuerpo monoclonal de ratón anti-M-CSF (Genzyme, USA) diluido en PBS-albúmina (0.25 %) a una dilución de 1:200 y se incubó durante 3 horas a 37 °C. La placa se lavó con PBS-TWEEN (0.1 %) y se le adicionó 100  $\mu$ l/pozo del conjugado (anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa) diluido con PBS-albúmina a una dilución 1:3000 2 horas a 37 °C, se lavó 4 veces con PBS-TWEEN (0.1 %) y se le adicionó a cada pozo 100  $\mu$ l del sustrato de la enzima 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / (OPD, orto-phenilediamina) (6 mg de sustrato en 12 ml de amortiguador de citratos pH. 5.0), se mantuvo durante 10 minutos en la obscuridad y se leyó a 490 nm en el lector de ELISA (BIOTEC ELx800, USA).

## **6.-Resultados.**

### **Viabilidad de las Líneas Celulares Expuestas a Diferentes Concentraciones y Tiempos de Cultivo con 5FU.**

En condiciones *in vitro*, la viabilidad o muerte celular, vía apoptosis depende del tipo y el estímulo de muerte, por lo que la mayoría de las drogas anticancerígenas tienen la capacidad de inducir apoptosis a concentraciones particulares para cada droga y tipo celular. Generalmente, a concentraciones bajas de la droga, una célula puede reparar los daños, ya que su maquinaria celular no es severamente afectada y a concentraciones más elevadas, los daños son tan drásticos que la célula muere por necrosis. Con la finalidad de evaluar el efecto del 5FU sobre la viabilidad en cada una de las líneas celulares L929, P388 y HL60, se emplearon diferentes concentraciones: 10, 60, 120, 200 y 400 ng/ml de la droga. Los ensayos de viabilidad se evaluaron a las 48 horas por medio de la técnica de exclusión de azul tripano.

Los resultados obtenidos indican que las líneas celulares L929, P388 y HL60 cultivadas en presencia de 5FU disminuyen su viabilidad rápidamente conforme aumentamos la concentración de la droga. A concentraciones entre 10 y 120 ng/ml la viabilidad disminuye ligeramente en HL60 y L929 a 88 % y 79 % respectivamente, mientras que la línea P388 presentó sólo el 52 %. Si aumentamos la concentración a 200 y 400 ng/ml la viabilidad disminuye aún más; ya que observamos en HL60 un 47 % y 22 % en P388, en tanto la línea L929 permaneció en 61 % (figura 1).



**Figura 1.-Efecto de las diferentes concentraciones del 5FU sobre la viabilidad de los cultivos celulares evaluados por el método de azul tripano a las 48 horas.**

Debido a que la apoptosis se induce de una manera sutil, y los porcentajes de muerte celular más altos se observaron a 200 y 400 ng/ml de 5FU, se decidió utilizar entonces una concentración de 60 ng/ml de 5FU en ensayos posteriores, ya que la muerte celular inducida a esta concentración son menores.

Para determinar el tiempo en el cual se alcanza la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) en presencia de 5FU, las líneas celulares L929, P388 y HL60 se cultivaron en presencia o ausencia de 60 ng/ml de 5FU y se evaluó nuevamente la viabilidad por el método de exclusión de azul tripano ahora en intervalos de 12 horas. Bajo estas condiciones, se detectó una gran diferencia en la susceptibilidad de las líneas L929, P388 y HL60 a la droga; la línea P388 presentó su  $LD_{50}$  a las 48 horas, HL60 a las 64 horas, mientras que la línea celular L929 presentó su  $LD_{50}$  a las 67 horas. Las líneas cultivadas en ausencia de 5FU a las 24 y 48 horas presentaron porcentajes de viabilidad mayores del 90 % hasta las 72 horas (controles). Por otro lado, las líneas cultivadas con 5FU, presentaron una disminución en los porcentajes de viabilidad desde las 12 horas de cultivo principalmente en P388 (85 %), mientras que L929 decae hasta las 24 horas en un 86 % y HL60 decae hasta las 60 horas al 76 % y finalmente, a las 72 horas sólo sobreviven el 46 %, 34 % y 22 % de las poblaciones de L929, P388 y HL60 respectivamente (figura 2).

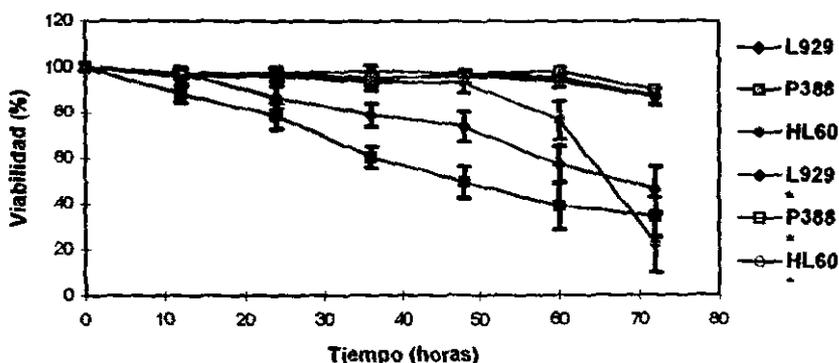
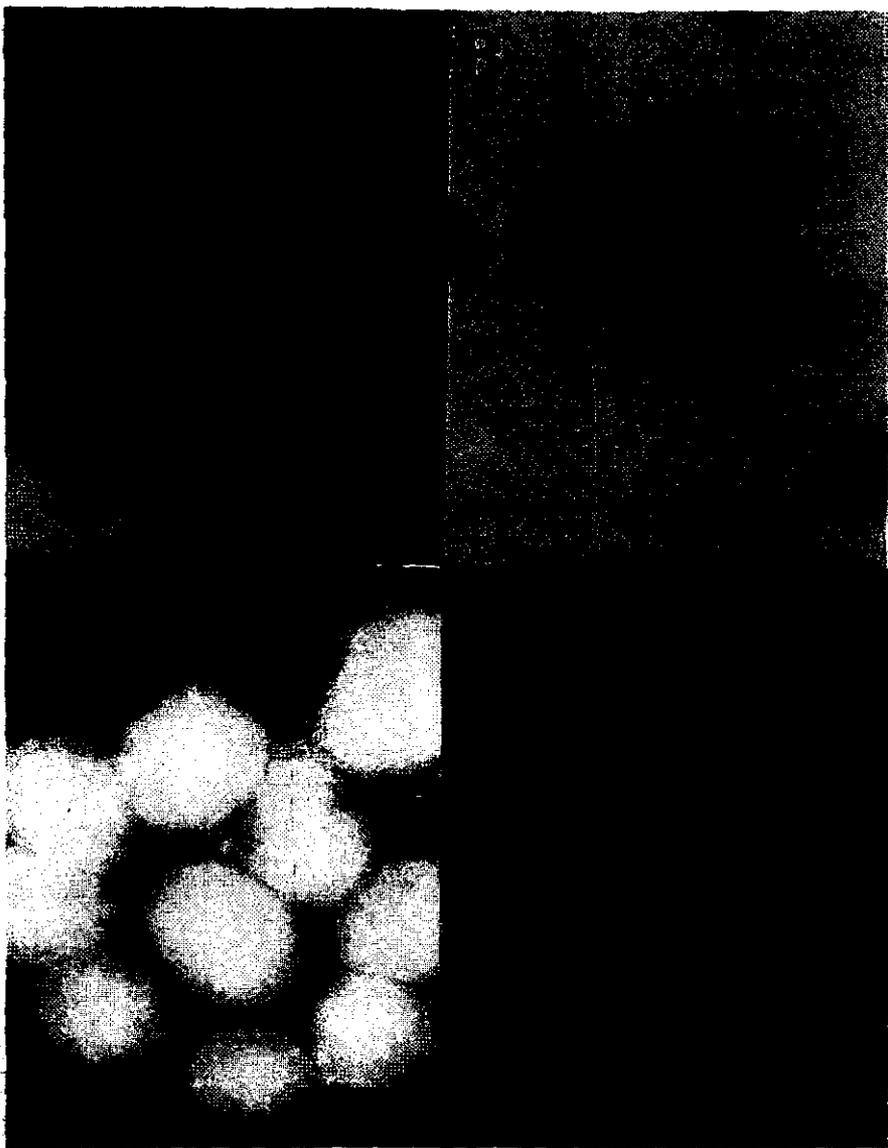


Figura 2.-Evaluación de la viabilidad a los diferentes tiempos en los cultivos de las líneas en presencia o ausencia de 5FU evaluado por azul tripano. (■) células cultivadas en RPMI y SFB 10% ; ( ) células cultivadas en RPMI, SFB y 5FU (60 ng/ml).

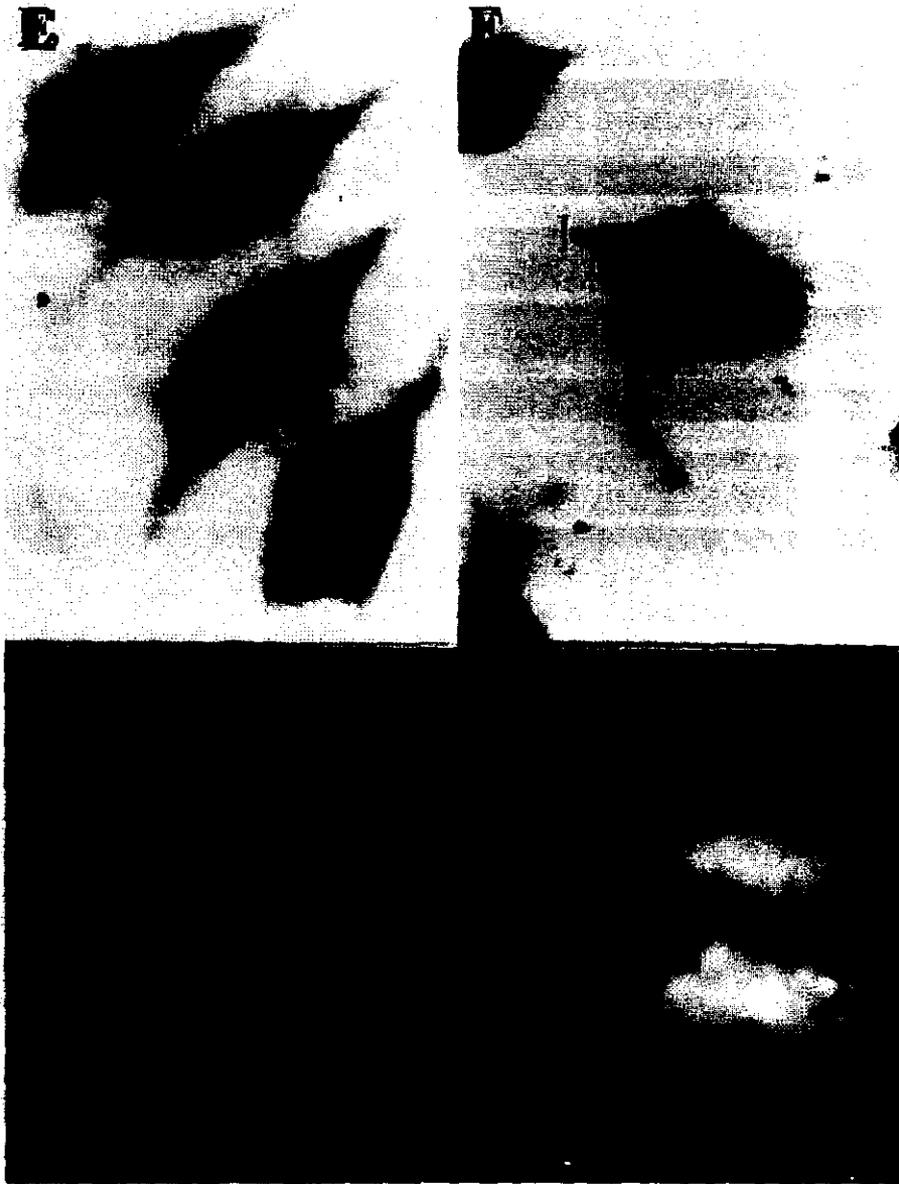
### **Evaluación de la Morfología Apoptótica en las Líneas Celulares Tratadas con 5FU por el Método de Tinción en Giemsa y Yoduro de Propidio.**

Para demostrar que las células cultivadas en medio RPMI, SFB al 10 % y 5FU mueren por apoptosis, se evaluó la morfología apoptótica de cada una de las líneas celulares usando la técnica de tinción con giemsa y con yoduro de propidio a las 48 h.

Durante el proceso de la apoptosis son observados diferentes cambios en la morfología de la célula como es la pérdida del volumen celular, condensación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales pueden observarse bajo el microscopio óptico. Los resultados obtenidos, mostraron que las líneas celulares en ausencia de 5FU presentaron las características normales de una célula como por ejemplo: una membrana intacta, un núcleo bien definido e intacto y el citoplasma estable (figuras 3A,C,E,G,I,K), mientras que en presencia de 5FU las líneas presentaron una disminución en su volumen celular y condensación del ADN, así como también se detectó la presencia de cuerpos apoptóticos (figuras 3B,D,F,H,J,L).



**Figuras 3 (A a D)-Línea celular HL60 cultivada en presencia de 5FU muere por apoptosis como se muestra mediante preparaciones en citospin teñidas con giemsa e yoduro de propidio a las 48 h. A y C: células cultivadas sólo en medio RPMI y S.F.B. 10%; B y D: células cultivadas en medios RPMI, S.F.B. 10% y 5FU 48h. A y B: células teñidas con Giemsa; C y D: células teñidas con yoduro de propidio bajo el objetivo de 100 X.**



**Figuras 3 (E a H)** - Línea celular P388 cultivada en presencia de 5FU muere por apoptosis como se muestra mediante preparaciones en citospin teñidas con Giemsa o yoduro de propidio a las 48 h. E y G: células cultivadas sólo en medio RPMI y S.F.B. 10%; F y H: células cultivadas en medios RPMI, S.F.B. 10% y 5FU 48h. E y F: células teñidas con Giemsa; G y H: células teñidas con yoduro de propidio bajo el objetivo de 100 X.



Figuras J (I a L).-Línea celular 1929 cultivada en presencia de SFU muere por apoptosis como se muestra mediante preparaciones en citospin teñidas con Giemsa o yoduro de propidio a las 48 h. I y K: células cultivadas sólo en medio RPMI y S.F.B. 10%; J y L: células cultivadas en medios RPMI, S.F.B. 10% y SFU 40h. I y J: células teñidas con Giemsa; K y L: células teñidas con yoduro de propidio bajo el objetivo de 100 X.

Con la finalidad de conocer los porcentajes de células inducidas a la apoptosis, se realizó conteo celular a 24, 48 y 72 horas en presencia de 5FU. Los resultados mostraron que a 24 horas se induce la apoptosis rápidamente en las líneas P388 y HL60 a 43 % y 35 % respectivamente, mientras que la línea L929 sólo presentó un 30 % de apoptosis. Sin embargo, a las 48 horas se alcanzaron los porcentajes máximos en las tres líneas, así L929, P388 y HL60 presentaron un 50 %, 75 % y 67 % respectivamente. Finalmente a las 72 horas, los porcentajes de células apoptóticas disminuyeron a 23 % en L929, 35 % en P388 y 19 % en HL60. Por lo tanto existe una respuesta diferencial en las tres líneas y P388 resultó ser más sensible al 5FU (figura 4).

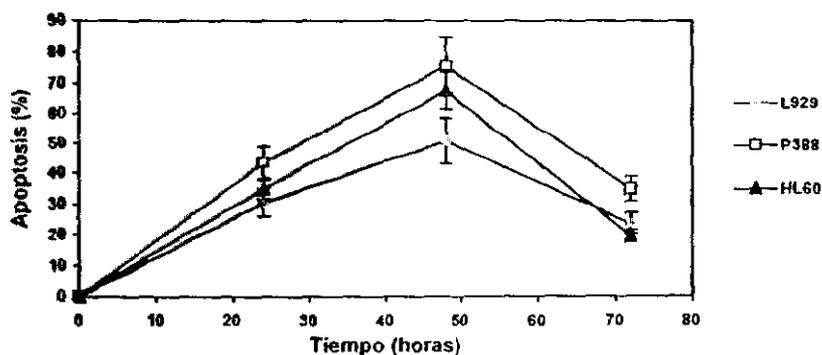


Figura 4.-Evaluación de la morfología apoptótica en las tres líneas celulares mediante citospines teñidos con giemsa en presencia de 5FU a diferentes tiempos.

### Determinación de la Fragmentación del ADN Mediante la Incorporación de Timidina Tritiada ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ).

La fragmentación del ADN puede observarse directamente en geles de agarosa ó indirectamente mediante la incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ) al ADN.

Con la finalidad de confirmar que las células mueran por apoptosis y el ADN es fragmentado, dicho evento se evaluó a las 0, 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos indican que las líneas cultivadas en medio RPMI, S.F.B. y marcadas con ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ) (control negativo) presentaron bajos porcentajes de fragmentación del ADN en las tres líneas. Mientras que las líneas cultivadas en medio RPMI, S.F.B., 5FU y ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ) aumentó con respecto al control negativo, así a las 24 horas la línea HL60 presentó sólo un 15 %, L929 un 35 % y P388 un 46 % de fragmentación de ADN. A las 48 horas los porcentajes aumentaron fuertemente en la línea HL60 a 56 %, mientras que en L929 y P388 sólo se presentó un ligero aumento de los porcentajes a 39 % y 56 % respectivamente. Finalmente, a las 72 horas la fragmentación del ADN alcanzó su nivel máximo en las líneas L929 y P388 a 48 % y 68 % respectivamente y la línea HL60 disminuyó al 47 % (figura 5).

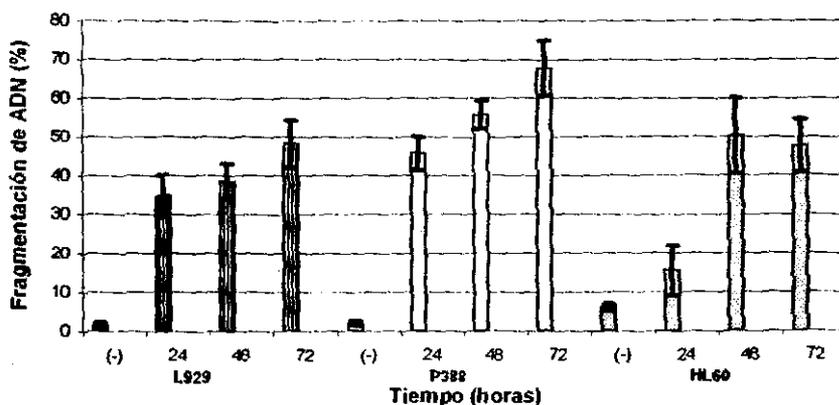


Figura 5-Evaluación de la fragmentación del ADN a través de la incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ) en presencia de 5FU. (-): células en medio RPMI suplementado con 10 % de SFB y ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ); (24, 48 y 72 horas): líneas celulares cultivadas a los diferentes tiempos con 5FU y ( $[^3\text{H}]\text{T}$ ).

## Eliminación del 5FU de los Medios Condicionados Obtenidos de las Líneas por Medio de Membranas de Diálisis.

Después de dializar los medios condicionados de las células cultivadas en presencia de 5FU, se evaluaron estos medios (sin 5FU) y sin dializar (con 5FU) sobre la línea macrofágica P388 a las 48 horas por la técnica colorimétrica del MTT. En presencia de los medios condicionados de L929 y HL60 sin dializar, se observó una viabilidad de aproximadamente 5 % y en presencia de los medios condicionados previamente dializados, éstos presentaron una viabilidad del 85-95 %, si tomamos como referencia las células que se cultivaron en medio RPMI y 10 % de SFB (control negativo), mientras que sólo el medio condicionado de pulmón al 20 %, medio RPMI, S.F.B. se observó proliferación celular (control positivo). Por lo tanto, nuestros medios condicionados dializados se les eliminó correctamente el 5FU (Figura 6).

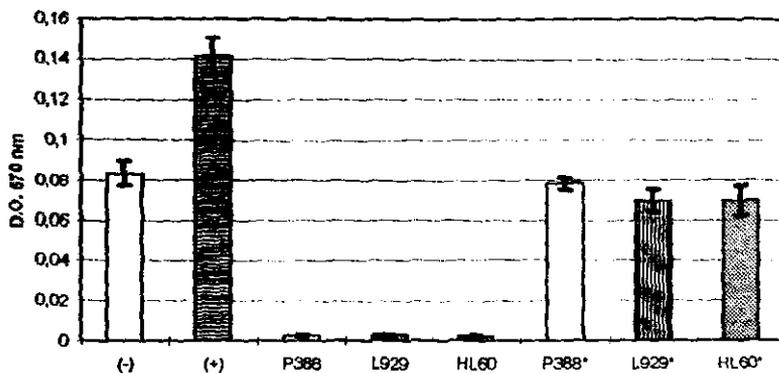
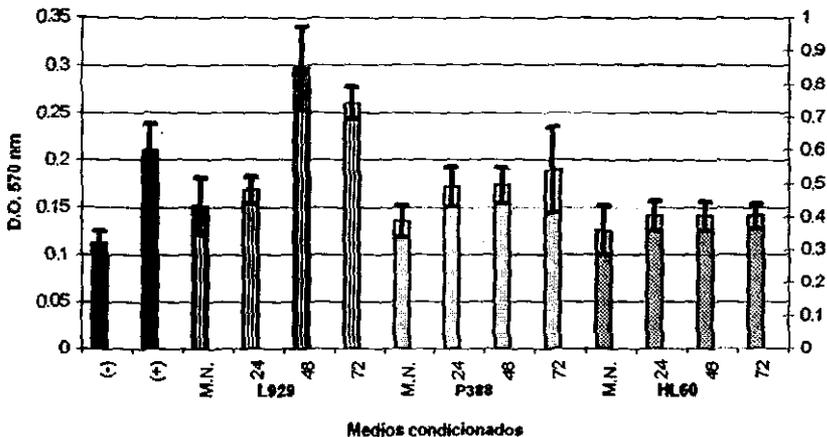


Figura 6.-Evaluación de la línea P388 en presencia de los medios condicionados concentrados previamente dializados (\*) y sin dializar (■) evaluado a las 48 horas por MTT. (-) : negativo, células en medio RPMI suplementado con 10 % de S.F.B.; (+) positivo, células en medio RPMI-10 % de S.F.B. y 20 % de medio condicionado de pulmón.

**Evaluación de la Supervivencia y Proliferación sobre Células Precursoras de Médula Ósea en Medio Líquido de los Medios Condicionados Obtenidos de los Cultivos con 5FU.**

El 5FU induce la apoptosis en las tres líneas celulares como se demostró anteriormente. Para determinar si los medios condicionados obtenidos de las células cultivadas en RPMI, S.F.B. y 5FU presentan una actividad proliferativa, éstos se evaluaron sobre células hematopoyéticas obtenidas de la médula ósea de ratón por MTT a las 48 horas. Los medios condicionados obtenidos de las líneas HL60 en presencia de 5FU no ejercieron ningún efecto proliferativo, sin embargo, los medios condicionados de las líneas P388 y L929 obtenidos de los cultivos con 5FU a las 48 y 72 horas, promueven la proliferación de las células hematopoyéticas de ratón (figura 7).



**Figura 7-Médula ósea total en presencia de los medios condicionados de las líneas celulares concentrados 30-50 veces y dializados evaluación con MTT. (-) negativo: medio Iscove suplementado con 20 % de suero de caballo (S.C.); (+) positivo: medio Iscove suplementado con 20 % de S.C. más 20 % de medio condicionado de pulmón; M.N: medios condicionados concentrados obtenidos a las 72 horas de cada una de las líneas celulares sin 5FU; 24: medios condicionados obtenidos a las 24 horas después del tratamiento con 5FU al 10 % (v/v); 48: medios condicionados obtenidos a las 48 horas al 10 % v/v; 72: medios condicionados obtenidos a las 72 horas al 10 % v/v.**

### Inducción a la Formación de Colonias de Médula Ósea en Agar por los Medios Condicionados de las Células en Presencia de 5FU.

Para determinar ahora que la citocina o grupo de citocinas, presentes en los medios condicionados con el 5FU, pertenecía al un grupo de citocinas hematopoyéticas, se evaluó su capacidad para formar colonias sobre células hematopoyéticas de la médula ósea en agar.

Los resultados obtenidos confirman que ninguno de los medios condicionados obtenidos de la línea HL60 cultivadas en presencia o ausencia de 5FU tienen la capacidad de formar colonias, pero ahora los medios condicionados tanto de P388 como de L929 cultivadas sólo con medio RPMI y S.F.B. tienen la capacidad formar colonias, principalmente del linaje monocito-granulocito, aún más interesante fue que los medios condicionados obtenidos de P388 y L929 cultivadas en medio RPMI, S.F.B. y 5FU forman e incrementan el número de colonias del mismo linaje, lo cual sugiere la presencia de una citocina hematopoyética en los medios condicionados (figura 8).

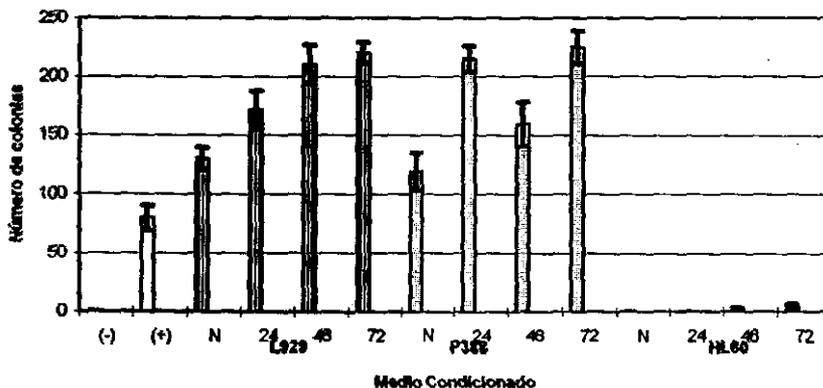


Figura 8.-Evaluación de la capacidad formadora de colonias de los medios condicionados concentrados y dializados obtenidos de las células en presencia de 5FU sobre células precursoras de médula ósea. (-) control negativo: medio RPMI suplementado con 20 % de S.C; (+) control positivo: medio RPMI suplementado con S.C. más medio condicionado de pulmón 20 %; M.N: medios condicionados concentrados obtenidos a las 72 horas de cada una de las líneas celulares sin 5FU; 24: medios condicionados obtenidos a las 24 horas después del tratamiento con 5FU; 48: medios condicionados obtenidos a las 48 horas; 72: medios condicionados obtenidos a las 72 horas.

### Identificación del M-CSF en los Medios Condicionados Obtenidos de los Cultivos con 5FU por el Método de ELISA.

Con la finalidad de saber si la formación de colonias de monocitos-granulocitos se debía a la presencia del M-CSF, por que L929 y P388 la sintetizan en forma constitutiva. Entonces se realizaron ensayos de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales contra M-CSF. Los resultados obtenidos indicaron que en los medios condicionados de ambas líneas se detectó la presencia del M-CSF en pequeñas cantidades (control), mientras que en los medios condicionados obtenidos de nuestras líneas con 5FU, la síntesis del factor permanece constante a las 24 y 48 horas en ambas líneas celulares (figura 9), lo cual indica que el 5FU no afecta la síntesis del factor M-CSF.

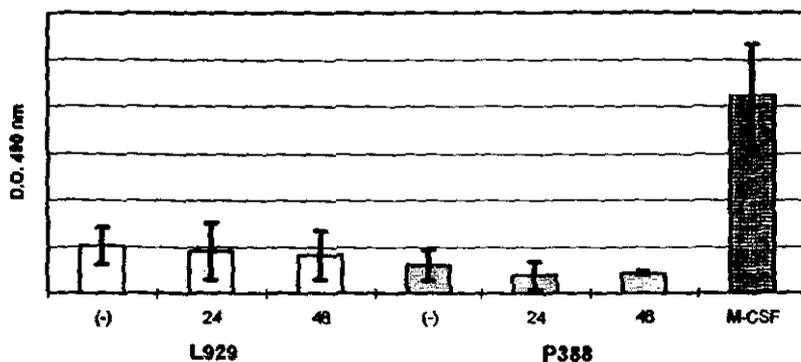


Figura 9.-Determinación del M-CSF en los medios condicionados obtenidos de las células cultivadas en presencia o ausencia de 5FU mediante anticuerpos monoclonales anti-M-CSF por la técnica de ELISA. (-): medios condicionados obtenidos en condiciones normales de cultivo (RPMI + SBF 10 %); 24: medios condicionados de los cultivos de cada una de las líneas celulares obtenidos a las 24 h con 5FU; 48: medios condicionados obtenidos de los cultivos a las 48 horas con 5FU; M-CSF: rM-CSF 50 ng/ml.

## 7.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el presente trabajo se determinó que tres líneas celulares de diferente linajes pueden ser inducidas a la apoptosis bajo ciertas condiciones de cultivo en presencia de 5FU. Cada una de estas líneas presentó un claro comportamiento diferente ante el mismo estímulo y concentración, lo que pone en claro las diferencias existentes entre cada una de las líneas celulares.

Por un lado se determinó, que sólo los medios condicionados de la línea fibroblástica y macrófagica, presentaron una clara activación de células de médula ósea en condiciones "normales" y también en estos medios se detectó la presencia del M-CSF. Por otro lado, sorpresivamente se determinó que los medios condicionados de éstas líneas pero ahora cultivadas con 5FU incrementaron la actividad proliferativa y diferenciadora. En los medios condicionados de la línea fibroblástica dichas actividades fueron más evidentes. Hay que destacar que sólo algunas líneas presentaron dicha actividad, ya que en HL-60 no se observó ninguna actividad e proliferación ni de diferenciación.

Durante el proceso hematopoyético que tiene lugar en la médula ósea, las células primitivas hematopoyéticas son estimuladas por factores estimulantes a proliferación o diferenciación cuando interactúan con sus respectivos receptores de membrana. Algunas citocinas que tienen esta capacidad son los factores como el GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-3, IL-6, principalmente, por lo tanto, puede ser una de estas citocinas que se encuentren en los medios condicionados de las líneas celulares inducidas a la apoptosis.

Algunos trabajos, demuestran el efecto de algunas drogas anticancerígenas en distintos tipos celulares, que tiene como vía final la muerte programada apoptótica, la cual, depende de muchos factores tanto externos como propios de cada línea celular, entre los más comunes están: la concentración, el tipo de droga, tipo celular, que se encuentren genes antiapoptóticos activados, en que fase del ciclo celular actúe la droga y el tiempo de cultivo (Eamshaw, 1995, Lin, X.S. et al. 1995; Tsurusawa, 1997; Murakami, T. et al. 1995). En el presente trabajo, se determinaron sólo la concentración y el tiempo de cultivo,

los cuales son de los parámetros más importantes para inducir la muerte celular programada apoptótica. Nosotros, utilizamos una concentración de 60 ng/ml para las tres líneas celulares, ya que por un lado, se consideró que ha mayores concentraciones pudicemos inducir muerte necrótica como ya se ha demostrado por Slater, A. y colaboradores (1995). Por otro lado, se consideró que a mayor tiempo de cultivo pero a bajas concentraciones se incrementa los porcentajes de células apoptóticas tal como lo demostró Murakami, T. y colaboradores (1995); y Kondo, S. y colaboradores (1996).

Se observó, que cultivando 48 horas nuestras líneas celulares con 60 ng/ml de 5FU se alcanzaron los niveles máximos de apoptosis, los cuales, disminuyeron a las 72 horas. Se ha observado, que las células apoptóticas al no ser fagocitadas por células profesionales como lo son los macrófagos o células dendríticas como se ha demostrado recientemente, sufren muerte necrótica secundaria. Entonces, pudiera ser que en nuestros cultivos se haya incrementado los porcentajes de células necróticas, lo cual puede explicar los niveles bajos de células apoptóticas a las 72 horas en los ensayos de fragmentación de ADN. En resumen, los porcentajes de células apoptóticas obtenidos a las 24 y 48 horas corresponden a muerte programada apoptótica, mientras a las 72 horas representaría principalmente células muertas por necrosis secundaria.

Una célula mielóide o linfóide normal esta sujeta a morir por apoptosis si se activa con la mayoría de los tipos de drogas, prácticamente en cualquier fase del ciclo celular es decir en G0, G1, S o G2 (Lin, X.S. et al. 1995). Sin embargo, en líneas celulares generalmente no se observa este patrón, ya que algunas líneas celulares son más susceptibles a sufrir muerte programada apoptótica en la fase S el ciclo celular, ya que algunas drogas afectan la estructura y la estabilidad del ADN en condiciones apropiadas (Hickman, J.A. 1992). Por ejemplo: la línea HL60 es más susceptible a sufrir una muerte apoptótica cuando entra en la fase dicha fase en presencia de drogas (Del Bino, 1994 ; Murakami, et al. 1995). Aunque, se ha encontrado que otros tipos celulares son más susceptibles a la muerte programada apoptótica al entrar en la fase G1 del ciclo celular.

Poco se sabe, acerca de que el 5FU tenga la capacidad de inducir muerte celular apoptótica sobre líneas celulares, aunque se ha observado sobre macrófagos de cavidad peritoneal que puede inducir muerte celular programada en la fase S y altera principalmente la replicación del ADN y el ARN (Prithchard, D.M. 1995; El Alaoui, 1997), Por lo tanto, es posible que el 5FU activa la vía apoptótica en la fase S del ciclo celular en las tres líneas celulares.

Como ya se mencionó, en ningún medio condicionado de HL60 se detectó proliferación o diferenciación sobre células hematopoyéticas de médula ósea. Previos trabajos ya habían demostrado que los medios condicionados de HL60 concentrados 100-250 veces no presentaban ninguna actividad formadora de colonias. Por lo tanto, al observarse que algunas líneas presentan un efecto proliferador y otras líneas no lo hacen nos sugiere que 1) puede deberse al estado de maduración indiferenciado o promielocítico de la línea HL60, ya que se ha demostrado que muy pocas células precursoras poseen la capacidad de sintetizar citocinas, mientras que L929 y P388 poseen un estado de maduración más avanzado que la línea HL60; y 2) que las citocinas sintetizadas por la línea HL60 no entrecruzan con las de ratón, es decir que sean especie-específicas, ya que HL60 es una línea derivada de leucemia humana y se evaluó sobre células hematopoyéticas de ratón aunque, ensayos realizados con los medios condicionados en presencia o ausencia de 5FU sobre fibroblastos normales de médula ósea de humano no se observó ningún efecto proliferador o hematopoyético (datos no mostrados); mientras que L929 y P388 ambas son de ratón y entrecruzan perfectamente.

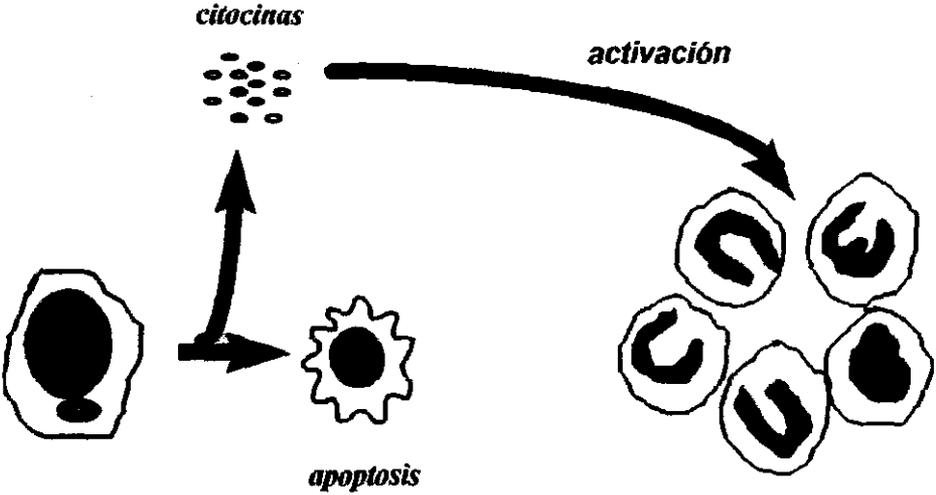
Trabajos previos desarrollados en el laboratorio demostraron que los medios condicionados de las líneas L929 y P388 son capaces de formar colonias de monocitos-

Algunos de trabajos recientes, en donde se pone de manifiesto la presencia de citocinas en células inducidas a la apoptosis son: el de Shetty y colaboradores (1996), quienes demuestran en biopsias de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD), un número muy elevado de células hematopoyéticas que se mueren por muerte programada apoptótica, por que existe un incremento en los niveles de las proteínas TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ , también observaron una *disminución* en la proteína GM-CSF. Las citocinas como el TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  en ciertas condiciones de cultivo pueden inducir este tipo de muerte celular. Esto nos lleva a suponer 1) las células son inducidas a morir por apoptosis debido a la presencia de TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ ; 2) las células apoptóticas secretan o sintetizan el GM-CSF, para tratar de restaurar el equilibrio celular. Sin embargo, debido a que se trata de un padecimiento, la concentración del TNF y TGF siempre estarán por encima del G-CSF y el individuo nunca alcanzara la homeostasis.

Se ha demostrado, en ciertos tipos celulares como por ejemplo, en los timocitos, cuando se inhibe la síntesis de proteínas, trae como consecuencia la activación de la vía apoptótica, y en otros tipos celulares, existen proteínas que se sintetizan *de novo*, las cuales son requeridas para acelerar la muerte celular. En resumen, pudieran existir vías "alternas", las cuales pudiera activar la síntesis de una citocina *de novo*, para tratar de que mantener un equilibrio interno; aunque es necesario realizar ensayos posteriores para determinar ssi existe síntesis de ARN mensajero para diferentes citocinas, utilizando técnicas moleculares como son : Northern blot, RT-PCR e hibridación *in situ*.

De los datos obtenidos en este trabajo, se propone el siguiente mecanismo de regulación hematopoyética : Las células maduras al entrar al proceso de muerte celular por la vía apoptótica, tienen la capacidad de secretar citocinas al microambiente hematopoyético. Dichas citocinas cuando se unen a sus receptores (los cuales están presentes en las células hematopoyéticas), desencadenan los eventos de fosforilación propios de la transducción de señales, se activan genes reguladores de la proliferación y se inicia la fase de síntesis de

ADN. A través de este proceso las células indiferenciadas proliferan y maduran hacia un linaje determinado restableciendo la homeostasis del organismo.



## **8.-CONCLUSIONES.**

**\* El SFU es una droga anticancerígena que induce muerte celular programada por apoptosis, a una concentración y tiempo de cultivo específico para cada línea celular.**

**\* En las células apoptóticas el SFU no afecta la síntesis de M-CSF.**

**\* La muerte celular programada por la vía apoptótica de cada una de nuestras líneas celulares induce la secreción de citocinas con actividad hematopoyética.**

## 9.-LITERATURA CITADA.

- An, S., and Knox, K.A. (1996).** Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt Lymphoma B Cells from Calcium Ionophore- and Antigen Receptor-triggered Apoptosis by Inhibiting Activation of the Cysteine Protease CPP32/Yama and Cleavage of its Substrate PARP. *FEBS Letters* 386 : 115-122.
- Barret, J.C. (1993).** Cell Senescence and Apoptosis. *Moleccular Genetics of Nervius System tumors*, pp 61-72.
- Beck, W. (1991).** Hematology. fifth edition. Edit. The MIT Press Cambridge. *United States of America*. pp 1-21.
- Borner, C. (1996).** Disminished Cell Proliferation Associated with the Death-protective Activity of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 12695-12698.
- Bortner, C.D., Nicklas B.E.O. and John A.C. (1995).** The Role of DNA Fragmentation in Apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5: 21-26.
- Bowen, I.D. and Sandra M.B. (1990).** Programmed Cell Death in Tumors and Tissues: Cell Death in Tissues. *De Chapman and All*. pp 15-29.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., and Green D.R. (1995).** Cell Autonomous Fas (CD95)/Fas-Ligand Interaction Mediates Activation-Induced Apoptosis in T-Cell Hybridomas. *Nature* 373: 441-444.
- Chen, Y.R., Meyer, C.F., and Tan, T.H. (1996).** Persistent Activation of c-jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) in  $\gamma$  Radition-Induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 631-634.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995).** FADD, a Novel Death Domain-containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis. *Cell* 81 : 505-512.

- Civin, C., Almeida-Porada, Lee, M., Olweus, J., Terstappen, L. and Zanjani, E. (1996).** Sustained, Retransplantable, Multilineage Engraftment of Highly Purified Adult Human Bone Marrow Stem Cells in vivo. *Blood* 88 : 4102-4108.
- Cohen, J.J. (1993).** Overview: Mechanism of Apoptosis. *Immunology Today* 56 : 106-110.
- Desbarats, L., Schneider, A., Müller, D., Bürgin, A. and Eilers, M. (1996).** Myc: A Single Gene Controls both Proliferation and Apoptosis in Mammalian Cells. *Experientia* 52 : 1123-1128.
- Dexter, T.M., Heyworth, C.M., Spooner, E., and Ponting, L.O.P. (1990).** The Role of Growth Factors in Self-renewal and Differentiation of Haemopoietic Stem Cells. *Phil. Transfution Real Society of London*. 327: 85-98.
- Duan, H., and Dixit, V.M. (1997).** RAIDD is a New "Death" Adaptor Molecule. *Nature* 385 : 86-89.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., and Young, J.D.(1997).** Suicidio Celular, en la Salud y en la Enfermedad. *Investigación y Ciencia. Febrero*, 44-52.
- Earnshaw, W.C. (1995).** Apoptosis: Lessons from in vitro Systems. *Trends in Cell Biology* 5 : 217-219.
- Earnshaw, W.C. (1995).** Nuclear Changes in Apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7 : 337-343.
- Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z., and Szondy, Z. (1996).** Transglutaminase Induction by various Cell Death and Apoptosis Pathways. *Experientia* 52 : 942-947.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiga, A.M., Kaelin W.G., Levingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996).** E2F-1 Fuctions in Mice to Promote Apoptosis and Suppress Proliferation. *Cell*.85 : 549-561.
- Flanagan, J., Leder, P. (1990).** The Kit Ligand: A Cell Surface Molecule Altered in Steel Mutant Fibroblasts. *Cell* 63 : 185-194.

- Frisch, S.M., Vuori, K., Kelaita, D., and Sicks, S. (1996).** A Role for Jun-N-Terminal Kinase in Anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. *Journal of Cell Biology* 135 : 1377-1382.
- Gajate, C., Alonso, M.T., Schimmang, T., and Mollinedo, F. (1996).** C-fos is not Essential for Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218 : 267-272.
- Geley, S., Hartmann, B.L., and Kofler, R. (1997).** Ceramides Induce a Form of Apoptosis in Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells That is Inhibited by Bcl-2, but not by CrmA. *FEBS Letters* 400 : 15-18.
- Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S. and G. Gualandi. (1995).** Protease Inhibitors Block Apoptosis at Intermediate Stages: A Compared Analysis of DNA Fragmentation and Apoptotic Nuclear Morphology. *FEBS Letters*. 377 : 9- 14.
- Hoquist, K. A., Nett, M.A. , Unanue, E.R., and D.D. Chaplin. (1991).** Interleukin 1 is Processed and Released During Apoptosis. *Proceeding Nature Academy Science United States of America* 88 : 8485-8489.
- Gordon, M.Y. Riley, G., Watt, S., and M.F. Greaves. (1987).** Compartmentalization of a Haematopoietic Growth Factor (GM-CSF) by Glycosaminoglycans in the Bone Marrow Microenvironment. *Nature* 326 : 403-405.
- Hale, J.A., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C. and Williams, G.T. (1996).** Apoptosis: Molecular Regulation of Cell Death. *European Journal of Biochemistry* 236 : 1-26.
- Handa, A. (1996).** Cytokines Regulate Apoptosis of Leukemic Cells. *Nippon Rinsho* 54 : 1797-1802.
- Handa, A., Kashimura, T., Kawano, N., Yamamoto, A., Yoshida, S., Jinnai, S., Murohashi, Y., Bessho, M. and Hirashima K. (1997).** Granulocyte-Colony Stimulating Factor Induced Apoptosis in Radiation-Induced Murine Leukemia Cell Line. *Leukemia* 11 supplement 3 : 387-388.

- Hickman, J.A.**, (1992). Apoptosis Induced by Anticancer Drugs. *Cancer metastasis Review* 11 : 121-139.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel V.** (1995). The TNF Receptor Signals Death and NF- $\kappa$ B Activation. *Cell* 81 : 495-504.
- Huang, D. C., Cory, S., and Strasser, A.** (1997). Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Adenovirus Protein E1B19kD are Functionally Equivalent in their Ability to Inhibit Cell Death. *Oncogene* 14 : 405-414.
- Jacobson, M.D., and Raff, M.C.** (1995). Programmed Cell Death and Bcl-2 Protection in very Low Oxygen. *Nature* 374 : 814-816.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C.** (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88 : 347-354.
- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., Khatib, M.E., Sherr, D.H., Stanger, B.Z., and Rothstein, M.A.** (1995). Fas(CD95)/FasL Interactions Required for Programmed Cell Death after T-Cell Activation. *Nature* 373 : 444-448.
- Jung, Y.K., Miura, M., and Yuan, J.** (1996). Suppression of Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme-mediated Cell Death by Insulin-like Growth Factor. *Journal Biological Chemistry* 271 : 5112-5117.
- Klein, G.** (1995). The Extracellular Matrix of the Hematopoietic Microenvironment. *Experientia* 51 : 914-923.
- Kondo, S., Kondo, Y., Yin, D., Barnett, G.H., Kaakaji, R., Peterson, J.W., Morimura, T., Kubo, H., Takechi, J. and Barna, B.P.** (1996). Involvement of Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme in Apoptosis of bFGF-deprived Murine Aortic Endothelial Cells. *FASEB Journal* 10 : 1192-1197.
- Koseki, T., Yamato, K., Krajewski, S., Reed, J.C. Tsujimoto, Y., and Nishihara T.** (1995). Activin A-Induced Apoptosis is Suppressed by BCL-2. *FEBS Letters* 376 : 247-250.
- Kumar, S. and N.L. Harvey.** (1995). Role of Multiple Cellular Proteases in the Execution of Programmed Cell Death. *FEBS Letters*. 375 : 169-173.

- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw. W.C. (1995).** Characterization of the Execution Phase of Apoptosis in vitro using Extracts from Condemned-Phase Cells. *Journal of Cell Science. Supplement 19: 41-49*
- Lin, X S., Denmeade, S R., and Isaacs, J T. (1995).** The Genetics of Programmed (Apoptotic) Cell Death. *Genetics and Cancer 25 : 173-194.*
- Long, M. (1992).** Blood Cell Cytoadhesion Molecules. *Experimental Hematology 20 : 288-301.*
- López, K.X., (1995).** Hematopoyésis. Fundamentos de Hematología. *Edit. Medica Panamericana. pp. 15-24.*
- Martins, M. L. and W. C. Earnshaw. (1997).** Apoptosis: Alive and Kicking in 1997. *Trends in Cell Biology 7 : 111-114.*
- Matzinger, P. (1991).** The JAM test A Simple Assay for DNA Fragmentation and Cell Death. *Journal of Immunological Methods 145 : 185-192.*
- Mayani, H. (1997).** Células Seminales/Progenitoras del Sistema Hematopoyético y su Interacción con Factores Reguladores de la Hematopoyésis. *Revista de Investigación Clínica 47 : 42-43.*
- Mayani, H., Guilbert LJ., Janowska-Wieczorek A. (1992).** A Biology of the Hematopoietic Microenvironmental. *European Journal of Haematology 49 : 225-233.*
- McDonnell, T.J., Beham, A., Sarkiss, M., Andersen, M.M. and Lo, P. (1996).** Importance of the Bcl-2 Family in Cell Death Regulation. *Experientia 52 : 1008-1015.*
- Metcalf, D. (1993).** Hematopoietic Regulators: Redundancy or Subtlety?. *Blood 83 : 3515-3523.*
- Min, A.J., Veléz, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and C.B. Thompson. (1997).** Bcl-x<sub>L</sub> forms an ion Channel in Syntetic Lipid Membranes. *Nature. 385 : 353-357.*

- Miura, M., Friedlander, R.M., and J. Yuan. (1995).** Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis is Mediated by a CrmA-Sensitive Cell Death Pathway. *Proceeding Nature Academy Science Unites States of America* 92 : 8318-8322.
- Montague, J.W., and Cidowski, J.A. (1996).** Cellular Catabolism in Apoptosis: DNA Degradation and Endonuclease Activation. *Experientia* 52 : 957-962.
- Moore, M. (1991).** Clinical Implications of Positive and Negative Hematopoietic Stem Cell Regulators. *Blood* 78 : 1-19.
- Müller-Sieburg, C.E., and E. Deryugina. (1995).** The Stromal Cells' Guide to the Stem Cell Universe. *Stem Cells* 13 : 477-486.
- Murakami, T., Li, X., Gong, J., Bhatia, U., Traganos, F., and Darzynkiewicz. (1995).** Induction of Apoptosis by 5-Azacytidine: Drug Concentration-dependent Differences in Cell Cycle Specificity. *Cancer Research* 55 : 3093-3098.
- Muzio, M., Salvesen, G.S., and V.M. Dixit. (1997).** FLICE Induced Apoptosis in a Cell-free System. *Journal of Biological Chemistry* 272 : 2952-2956.
- Olsson, I., Gullbert, U., Lantz, M., and Richter, J. (1992).** The Receptors for Regulatory Molecules of Hemopoiesis. *European Journal of Haematology* 48 : 1-9.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J. Moore, A., and A. Ashkenazi. (1996).** Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 12687-12690.
- Frühchard, D.M., Watson, A.J.M., Potten, C.S., Jackman, A.L., and Hicman, J.A. (1997).** Inhibition by Uridine but not Thymidine of p53-dependent Intestinal Apoptosis Initiated by 5-Fluorouracil: Evidence for the Involvement of RNA Perturbation. *Proceeding. Nature Academy Science Unites States of America* 94 : 1795-1799.
- Rajapaksa, R., Ginzton, N., Rott, L.S. and Greenberg, P.L. (1996).** Altered Oncoprotein Expression and Apoptosis in Myelodysplastic Syndrome Marrow Cells. *Blood* 88 : 4275-4287.

- Raza, A.** (1997). Suppression of Apoptosis in Hematopoietic Cells of Myelodysplastic Patients Produce Clinical Responses. *Revista de Investigación Clínica* 47 : 15.
- Reynolds, J.E., and Eastman, A.** (1996). Intracellular Calcium Stores Are Not Required for Bcl-2-mediated Protection from Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 27739-27743.
- Richter, C., Schweizer, M., Cossarizza, A., and C. Franceschi.** (1996). Control of Apoptosis by the Cellular ATP Level. *FEBS Letters*. 378 : 107-110.
- Rifkind, R.A., Bank, A., Marks, P.A., Kaplan, K.L., Ellison, R.R. and J. Lindenbaum.** (1988). Aspectos de la Hematopoyésis. *Hematología Clínica. Edit. Interamericana. 3a edición. pp. 1-6.*
- Ruiz, R.M.C., Oliver, F.J., Izquierdo, M., and Rivas, A.L.** (1995). Activación-induced Apoptosis in Jurkat Cells through a Myc-independent Mechanism. *Molecular Immunology* 32 : 947-955.
- Samali, A., Gorman, A.M., and T.G. Cotter.** (1996). Apoptosis - the Story so Far... *Experientia* 52: 933-939.
- Shetty, V., Mundle, S., Alvi, S., Showel, M., Broady-Robinson, L., Dar, S., Borok, R., Showel, J., Gregory, S., Rifkin, S., Parcharidou, A., Venugopal, P., Shah, R., Hernandez B., Klein, M., Alston, D., Robin, E., Dominquez, C. and Raza, A.** (1996). Measurement of Apoptosis, Proliferation and three Cytokines in 46 Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia research* 20 (11-12) : 891-900.
- Slater, A.M.S., Stefan, C.I., Dobbelsteen, D.J., and Orrenius, S.** (1995). Signalling Mecanismos and Oxidative Stress in Apoptosis. *Toxicology Letters* 82/83 : 149-153.
- Squier, M.K.T., Miller, A.C.K., Malkinson, A.M., and Cohen, J.J.** (1994). Calpain Activation in Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 159 : 229-237.
- Stanger, B.Z., Phillip, L., Lee, T.H., Kim, E., and Seed, B.** (1995). RIP : A novel Protein Containing a Death Domain That Interacts with Fas/APO-1 (CD95) in Yeast and Causes Cell Death. *Cell* 81: 513-523.

- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., and Reed, J.C.** (1995). Cloning and Functional Analysis of BAG-1: A Novel Bcl-2-Binding Protein with Anti-Cell Death Activity. *Cell* 80 : 279-284.
- Testa, N.G. and T.M. Dexter.** (1990) Haemopoietic Growth Factors and Haematological Malignancies. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 4:177-188.
- Tushar P., Gores, J.G., and S.H. Kaufmann.** (1996). The Role of Proteases during Apoptosis. *FASEB Journal* 10: 587-597.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J.** (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-Related Gene, Encode Both Positive and Negative Regulators of Programmed Cell Death. *Cell* 78 : 739-750.
- Watari, K., Mayani, H., Lee, F., Dragowska, W., Lansdorp, P, Schrader, J.** (1996). Production of Interleukin-1 $\beta$  by Human Hematopoietic Progenitors Cells. *Journal Clinical of Investigation* 97 : 1666-1674.
- Whyte, M.** (1996). ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trens in Cell Biology*. 6 : 245-248.
- Williams, G.T.** (1994). Apoptosis in the Immune System. *Journal of Pathology*. 173 : 1-4.
- Wu, D., Wallen, H.D. and Nuñez G.** (1997). Interaction and Regulation of Subcellular Localization of CED-4 by CED-9. *Science* 275 : 1126-1129.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J.** (1997) Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-xL and Bcl-2, Displaces Bax and Promotes Cell Death. *Cell* 80 : 285-291.
- Yonish-Rouach, E.** (1996). The p53 Tumour Suppressor Gene: A mediator of a G1 Growth arrest and of Apoptosis. *Experientia* 52 : 1001-1005.
- Zhivotovsky, B., Burgess, D.H. and Orrenius, S.** (1996). Proteases in Apoptosis. *Experientia* 52 : 968-976.

## APÉNDICE 1

### Medio RPMI-1640.

El medio se utilizó para mantener en condiciones fisiológicas estables a las líneas celulares P388 y L929. El siguiente listado proporciona los componentes del medio.

Aminoácidos	mg/l
L-Arginina (libre de base)	200.00
L-Asparagina (Anhidra)	50.00
L-Aspártico	20.00
L-Cistina 2 HCl	65.20
L-Ácido Glutámico	20.00
L- Glutamina	300.00
Glicina	10.00
L-Histidina (libre de base)	15.00
L-Hidroxiprolina	20.00
L-Isoleucina	50.00
L-Leucina	50.00
L-Lisina Hcl	40.0
L-Metionina	15.00
L-Fenilalanina	15.00
L-Prolina	20.00
L-Serina	30.00
L-Treonina	20.00
L-Triptófano	05.00
L-Tirosina 2Na	28.83
L-Valina	20.00

<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Biotina	00.20
D-Pantotenato	00.25
Ácido Fólico	03.00
Cloruro de Colina	01.00
Mio-Inositol	35.00
Niacienamida	01.00
PABA	01.00
Piridoxina HCl	01.00
Riboflavina	00.20
Tiamina HCl	01.00
Vitamina B12	00.005

<b>Sales Inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>
--------------------------	-------------

Nitrato de Calcio 4H <sub>2</sub> O	100.00
Cloruro de Potasio	400.00
Cloruro de Sodio	6000.00
Sulfato de Magnesio	48.84
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	80.00

<b>Otros Compuestos</b>	<b>mg/l</b>
-------------------------	-------------

D-Glucosa	2000.00
Glutación reducido	01.00
Rojo Fenol, Na	05.00
HEPES	5958.00

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

Forma de prepararse : en 950 ml de agua pentadestilada se diluyen 10.39 g de RPMI -1640 (Sigma, USA), se adicionan 2.0 g de bicarbonato de sodio, además los antibióticos penicilina G100 u/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml, agitándose hasta disolver sin sobre agitar. El medio se ajusta a un pH de 7.2 - 7.4, y se esterilizó con un filtro de membrana de 0.22 µm en presencia de CO<sub>2</sub>, finalmente el RPMI se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

## APÉNDICE 2

### Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Esta solución se usó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es proporcionadas por las sales de fosfatos. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000 ml de agua pentadestilada.

Componentes	g
Cloruro de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1
Cloruro de Sodio	8.0
Cloruro de Potasio	0.2
Fosfato ácido de Sodio	2.16
Fosfato diácido de Potasio	0.2

En la mayoría de ocasiones se prescindió de calcio y magnesio, estas sales no son indispensables para la finalidad en este trabajo. Las restantes sales se diluyen en 800 ml de agua bidestilada por agitación. posteriormente se afora a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 - 7.4. la solución amortiguadora se esterilizó

utilizando filtros de membrana (milipore, USA) con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de uso.

### APÉNDICE 3

#### Solución Amortiguadora de Carbonatos.

Esta solución se utiliza para estabilizar las inmunoplasmas en el ensayo de ELISA, y se prepara de la siguiente manera:

Componentes	g
Carbonato de Sodio	4.24
Bicarbonato de Sodio	5.04

Todos los componentes se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustándose a un pH de 9.5. Se almacena a 4°C hasta su uso.

### APÉNDICE 4

#### Solución Amortiguadora de Citratos.

Esta solución se utiliza para disolver el sustrato de la enzima peroxidasa (OPD, orto-phenyldiamina) en el ensayo de ELISA, y se prepara de la siguiente manera:

Componentes	g
Ácido Cítrico	21.01
Fosfato Monoácido de Sodio	28.40

Se preparan soluciones stock de ácido cítrico y fosfato monoácido de sodio en 1000 ml de agua bidestilada cada una por separado. Se toman 48.5 ml de la solución de ácido cítrico y se agregan a 51.01 ml de la solución de fosfato monoácido de sodio. Se ajusta el pH de 5.6 y se almacena a 4°C hasta su uso.

## **APÉNDICE 5**

### **Dasactivación del Suero.**

Se tomo una botella de Suero Fetal de Bovino (Hyclone, USA) y se colocó en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasó a un baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 100 ml para su mejor uso.