



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"EXPRESION DE LA CICLOOXIGENASA 2 (COX-2), E INDUCCION DE APOPTOSIS POR MEDIO DEL CELECOXIB EN EL GLIOMA C6 DE RATA in vitro. POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B O L O G O
P R E S E N T A :
ANTELMO RAMIREZ MARTINEZ

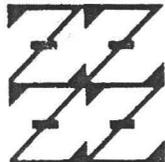
DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA TREJO SOLÍS
INVESTIGADORA TIPO "B" DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA, Y NEUROCIURGÍA,
"MANUEL VELASCO SUÁREZ

ASESOR INTERNO: DRA. ELIA ROLDÁN REYES
PROFESOR DE CARRERA TITULAR "A" DE T.C. DE LA FES ZARAGOZA

MEXICO, D. F.

MAYO 2005

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

0350233



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

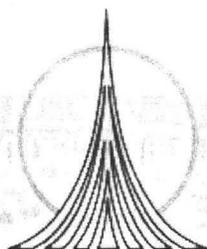
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



"EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA 2 (COX-2), E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR MEDIO DEL CELECOXIB EN EL GLIOMA C6 DE RATA *in vitro*. POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS"

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez".

Para la elaboración de esta investigación, se recibió el apoyo financiero de beca por parte de CONACyT y de la Fundación Armstrong y solicitada en el proyecto 41997-Modalidad A-1.

AGRADECIMIENTOS

♣ En primer lugar agradezco a mí Mamá Guillermina Martínez, por haberme dado la vida y que nunca ha dejado de creer en mí, quien ha velado por que siga siempre adelante.

♣ A mí Papá Raúl Ramírez, quien me ha sabido dar los mejores consejos de la vida quien ha estado conmigo en todo momento.

♣ A la persona que supo ser Madre y Padre al mismo tiempo, esa persona que gracias a ella he podido culminar esta carrera, quien me apoyado incondicionalmente, la persona que más respeto y a quien siempre le estaré agradecido... Mi hermana Perfecta Eleuteria.

♣ A mí hermano Carlos y su esposa Teresa, quienes me han vertido muchos de sus sabios consejos y quien me han demostrado que la hermandad, amistad y compañerismo si existen.

♣ A mí hermano Omar y su esposa Natividad, quienes desde lo lejos han estado al pendiente de mí y quienes me han brindado su ayuda incondicional.

♣ A mí hermana Alma, quien me ha brindado su compañerismo y que nunca me ha dejado solo y quien siempre se ha preocupado por mí y de que me alimente adecuadamente.

♣ A mí hermano Ángel David y mi sobrina Marlene Ivette.

♣ A mis otras sobrinas: Vanessa Anahí, Liz Viridiana, Iván y Keiry.

♣ A todos mis tíos, tías, abuelitos y abuelitas.

AGRADECIMIENTOS

A mí directora de tesis la **Dra. María Cristina Trejo Solís** por su incondicional asesoría, compañerismo, paciencia, sabiduría y dirección en la realización del presente trabajo.

A los sinodales:

- Dr. Mario Altamirano Lozano.
- Dra. Elia Roldán Reyes.
- M en C. María del Carmen García Rodríguez.
- Biol. María Cristina Alvarado Domínguez.

Por su tiempo, paciencia y aportaciones durante el desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación y por permitirme aprender de ustedes.

A todos los integrantes del Laboratorio de Neuroinmunología:

- Dr. Julio Sotelo Director del INNN.
- Dra. Esperanza García Jefa de Departamento de Investigación.
- M. en C. Guadalupe Palencia Jefa del Laboratorio de Neuroinmunología.
- Dra. Lucida Aguirre.
- Médico General Elizabeth Escobar.
- Y las demás personas que laboran en ese lugar.

Por hacer posible un ambiente cordial de trabajo, y por la ayuda que siempre me brindaron.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros y amigos que nunca dejaron de apoyarme en los momentos que más los necesitaba y que siempre estaban alentándome en la realización de este trabajo:

- Alberto Ortiz Rivera.
- Aldo Cerón Trujano.
- Arturo Huitzilihuitl Atilano Alvarado.
- Beatriz Fajardo Morales.
- Eloisa Reyes Sánchez.
- Elvira Hernández Ramos.
- Esteban Olvera Juárez.
- Francisco Javier Valtierra Juárez.
- Gabriela García Alberto.
- Genaro Montaña Arias.
- Gladys Madrigal Villaseñor.
- Israel Estrada Contreras.
- Leonardo López Medina.
- Luis Antonio Nolasco Ramírez.
- Mario Sinai Tinoco Juárez.
- Mónica Árciga Medina.
- Rosalía Vázquez López.
- Santiago Ariel Kú May.
- Selene Rodríguez Castillo.
- Yadira Mora Puente.
- Yolanda Santiago Moreno.

Agradecimientos especiales:

Elizabeth Escobar Hernández
Eloisa Reyes Sánchez
Elvira Hernández Ramos
Aldo Cerón Trujano
Alberto Ortiz Rivera
Genaro Montaña Arias

¡¡¡¡¡ A TODOS ELLOS LES DOY LAS GRACIAS ¡¡¡¡!

La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.

Ruy Pérez Tamayo
científico mexicano

Ciencia es el arte de crear ilusiones convenientes, que el necio acepta o disputa, pero de cuyo ingenio goza el estudioso, sin cegarse ante el hecho de que tales ilusiones son otros tantos velos para ocultar las profundas tinieblas de lo insondable.

Karl Gustav Jung

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
• Mecanismo dependiente de la actividad de la Ciclooxygenasa 2.....	12
• Mecanismo independiente de la actividad de COX-2.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. MÉTODO.....	24
• Determinación de los niveles de la enzima COX-2 por Western blot.....	24
• Purificación del celecoxib.....	25
• Efecto del celecoxib sobre las células de glioma C6.....	25
• Ensayos de viabilidad celular.....	26
• Determinación de apoptosis.....	26
• Determinación de los mecanismos moleculares.....	28
• Análisis Estadístico.....	29

6. RESULTADOS	29
• Viabilidad celular por ensayos de Metil Tetrazolium (MTT).....	29
• Expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular.....	30
• Determinación de apoptosis por doble tinción (Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio).....	31
• Prueba de Anexina 5.....	33
• Citometría de Flujo.....	35
• Determinación de apoptosis por electroforesis (Patrón de Escalera).....	36
• Expresión de la Procaspasa-3.....	37
• Expresión de la Poli ADP Ribosa Polimerasa.....	39
• Efecto de la PGE ₂ sobre la actividad antiproliferativa del celecoxib en células de glioma C6 de rata.....	40
• Niveles de expresión de Bcl-2.....	42
• Niveles de expresión de IκBα.....	43
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIONES	53
9. REFERENCIAS	54

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto del celecoxib, sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y los mecanismos involucrados en el evento de la apoptosis, en la línea celular glioma C6 de rata *in vitro*.

Para estudiar el efecto del celecoxib sobre la proliferación celular, se tomaron grupos de cultivos de células C6 de glioma de rata: controles, tratados con dimetil sulfóxido (DMSO), tratadas con celecoxib (cbx) y grupos de células tratadas con celecoxib más prostaglandina E₂ (PGE₂), en tiempos de tratamiento de 2, 4 y 6 horas respectivamente. Al finalizar los tratamientos, se determinó la viabilidad celular por ensayos de Metil tetrazolium (MTT).

Los resultados sugieren que el celecoxib es capaz de inducir apoptosis ($p < 0.001$) con concentraciones de 50 y 75 μM de manera proporcional al tiempo de exposición. Cuando las células son tratadas con una concentración de 25 y 50 μM celecoxib en presencia de Prostaglandina E₂; las células revierten el efecto del compuesto y son rescatadas en un 100% y cuando se utiliza una concentración de 75 μM de celecoxib, las células no son capaces de ser rescatadas de la apoptosis ($p < 0.001$), después de 6 horas de tratamiento.

En la determinación del efecto apoptótico generado por el celecoxib sobre la línea celular glioma C6 de rata, se utilizó la técnica de Western blot, analizando los niveles de expresión de las proteínas PCNA, activación de la Caspasa 3 y la hidrólisis de PARP.

El celecoxib, es capaz de disminuir ($p < 0.01$) los niveles de procaspasa 3 e incrementar los de la caspasa 3, ejerce un efecto importante en la hidrólisis y disminución de la PARP y se observa una menor expresión ($p < 0.01$) de la proteína PCNA.

Para conocer el porcentaje de apoptosis y las fases en las que se encontraban las células después del tratamiento, se realizó la prueba de anexina V/ yoduro de propidio y la técnica de citometría de flujo con yoduro de propidio, respectivamente.

Los resultados muestran que las células tratadas con 50 μM de celecoxib después de 6 horas de tratamiento, un 55% están vivas, el 30% apoptosis tardía, el 7% necróticas y el 8% se encuentran en apoptosis temprana. Con la concentración de 75 μM de celecoxib, se observa que la mayor parte de las células son necróticas (65%), en apoptosis tardía (20%) en apoptosis temprana un 2% y células aún vivas un 13%, después de 6 horas de tratamiento.

Para observar el tipo de muerte celular apoptótica y necrótica, se aplicó la técnica de la doble tinción naranja de acridina/bromuro de etidio.

Se observó que la mayor cantidad de células, se encuentran vivas y le siguen las que están en apoptosis tardía, mostrando una gran cantidad de núcleos verdes fragmentados (característica de la apoptosis) cuando se utiliza una concentración de 50 μM de celecoxib y en la concentración de 75 μM de celecoxib, se observan muchos núcleos rojos (característica de la necrosis), además de haber una gran cantidad de núcleos verdes fragmentados y pequeña cantidad células aún vivas.

Para conocer si el efecto proapoptótico del celecoxib es mediante un mecanismo dependiente o independiente de la actividad de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), se determinaron en cada uno de los cultivos, los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 e I κ B α proteína inhibitoria del factor transcripcional NF- κ B, mediante las técnicas de Western blot.

Se encontró que la expresión de Bcl-2 no cambió después de 6 horas de haber tratado las células con celecoxib y los niveles de expresión de la proteína I κ B α se ven incrementados después de 6 horas de exposición con el compuesto.

Los datos obtenidos permiten concluir que el celecoxib ejerce un efecto apoptótico en la línea celular glioma C6 de rata *in vitro*, a bajas concentraciones de celecoxib 25 y 50 μM en presencia de PGE₂, actúa como un mecanismo dependiente de la actividad de la ciclooxigenasa 2 y a concentraciones altas >75 μM , actúa como un mecanismo independiente de la actividad de la ciclooxigenasa 2. La apoptosis observada en la línea celular glioma C6 de rata es independiente de la proteína antiapoptótica Bcl-2. En las células tratadas con altas dosis de celecoxib, se encontraron niveles más altos de la proteína I κ B α en comparación con el grupo control. Finalmente este hallazgo sugiere que uno de los posibles mecanismos de acción involucra la posible inactivación del factor transcripcional NF- κ B.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos que se ramifican de los ya existentes, usualmente de una vénula, y se sabe que este suele ser el evento primario en la mayoría de las condiciones patológicas, tal y como ocurre en la vascularización de los tumores.

La angiogénesis es factor fundamental para la producción, el desarrollo y la reparación tisular; todo ello depende del crecimiento regulado de los vasos sanguíneos ya que si no se controla conduce a la situación que mantiene el progreso de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, el crecimiento tumoral va siempre asociado a proliferación vascular sin la cual no es posible la multiplicación de las células neoplásicas (D'Amore, 1999).

La mayoría de los tumores se desarrollan de una lesión primaria *in situ*, no mayor de 2 a 3 mm³, asintomático, que puede permanecer totalmente a vascular por meses o años; de repente un pequeño grupo de las células tumorales cambia a un fenotipo angiogénico y se inicia una rápida vascularización. Las células tumorales pueden expresar uno o varios de los factores reguladores positivos de angiogénesis, como el Factor de crecimiento endotelial vascular, Receptor del Factor de crecimiento endotelial vascular, Ciclooxygenasa-2, Factor de crecimiento epidérmico y el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Folkman, 1995).

En cuanto a los tumores del sistema nervioso central (SNC), los gliomas malignos (GM) son los tumores cerebrales primarios más frecuentes. Los tres tipos histopatológicos más frecuentes son: el glioblastoma multiforme (GBM) de grado IV, el astrocitoma anaplásico de grado III y el oligodendroglioma anaplásico (OA) de grado III (Molina, 2002), con una frecuencia de 5-8 casos por cada 100,000 habitantes (De Angelis, 2001).

Los gliomas malignos, causan globalmente un 2% de las muertes por cáncer, se caracterizan por una historia natural particular, que les distingue de la mayoría de las neoplasias sólidas y por ser resistentes a diferentes tratamientos como el quirúrgico, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia sistémica o local (Molina 2002). El término glioma hace referencia a los tumores derivados del tejido glial cerebral (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias) (Zamora y Espinosa, 1994).

- Los astrocitomas infiltrantes difusos, son los tumores más comunes del SNC ocupan el 60% de todos los tumores primarios y tienden a ser malignos.
- Los astrocitomas difusos de alto grado de malignidad, son tumores de pronóstico sombrío, con tendencia a reaparecer tras un tratamiento quirúrgico (con o sin radioterapia/quimioterapia).

Estos tumores se distinguen por la heterogeneidad de la población celular glial del que están constituidos, con predominio de glia anaplásica que se produce

rápidamente, presentan imágenes de mitosis muy abundantes y rica neovascularización con hiperplasia endotelial, frecuentemente tan intensa que causa obstrucción vascular y por ende abundantes áreas de necrosis tisular que actúan a su vez con estímulo hipóxico inductor de angiogénesis (Black, 1995; Plate, 1995; Plate, 1999; Bikfalvi, 1999; Samoto, *et al.*, 1995).

Tanto el GBM como el AA, se caracterizan por presentar altas tasas de proliferación celular y angiogénesis (Plate 1995; Lundal *et al.*, 1998), ambos procesos están relacionados con la capacidad para producir factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), (Moriyama, *et al.*, 1995; Strugar, *et al.*, 1995, Cheng, *et al.*, 1996; Guerin & Laterra 1997; Strugar, *et al.*, Jensen, 1998; Strugar, *et al.*, 1999, Schmidt, *et al.*, 1999; Arrieta, *et al.*, 2001 a/b).

Las prostaglandinas son sintetizadas en algunos tejidos de manera autócrina y parácrina (Jackel, 2001).

Diferentes reportes indican que el ácido araquidónico no existe en forma libre en el interior de las células, normalmente está esterificado en los fosfolípidos de membrana, especialmente en la posición C₂ de la fosfatidilcolina y del fosfatidilinositol. La liberación del ácido araquidónico, procede de la hidrólisis de los fosfolípidos estructurales de la membrana celular, en un proceso catalizado por la

fosfolipasa A₂ (PLA₂) y en plaquetas en el ser humano por la diacilglicerol lipasa (Presscott y Majereus, 1983), o por el incremento citosólico de calcio (Ca²⁺), el cual también activa estas enzimas (Smith, 1992).

Los estímulos físicos hacen que penetre el ión Ca²⁺ a la célula alterando la membrana celular provocando la activación de la fosfolipasa A₂, la cual hidroliza los fosfolípidos de membrana con liberación del ácido araquidónico. Una vez liberado parte del ácido araquidónico es metabolizado en forma rápida hasta obtener varios productos oxigenados por acción de diferentes sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa o familias de citocromo P-450 (Okazaki, 1981).

La síntesis de los mediadores inflamatorios abarca tres fases principalmente: 1) la movilización del ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana celular, mediada por la actividad de la enzima fosfolipasa A₂; 2) la conversión a endoperóxido de prostaglandina PGG₂ y PGH₂, mediante la acción de una enzima ciclooxigenasa (COX), también llamada prostaglandin endoperóxido sintasa y 3) la isomerización o reducción del endoperóxido PGH₂ hacia una serie de derivados biológicamente importantes, como son las prostaglandinas de la serie E (PGE₂), D (PGD₂), F (PGF_{2α}), J (PGJ₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXA), lo cual requiere de enzimas sintasas específicas, el ácido araquidónico, también puede ser transformado para producir leucotrienos (LTs) y otros eicosatetranoicos (HETEs), a través de una enzima lipooxigenasa (LO) (Holgate, *et al.*, 1987; Vane, 1995; Hansen, *et al.*, 1999; Sumitani, *et al.*, 2001; Kakiuchi, *et al.*, 2002). Todos estos compuestos contribuyen a

la formación del exudado vascular debido al efecto vasodilatador de las PGs (Vane, 1995; Evans, *et al.*, 2001).

En cuanto a los miembros de la ciclooxigenasa (COX), se ha demostrado la existencia de al menos dos isoformas; las mejores descritas son la Ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la Ciclooxigenasa 2 (COX-2), las cuales mantienen un 60% de los aminoácidos de las dos isoformas de manera idéntica, sin embargo, en la región del sitio activo, la homología aminoacídica es aproximadamente del 90% y ambas isoformas contienen un largo y estrecho canal hidrofóbico con una curvatura en orquilla al final para acomodar el ácido araquidónico que ambas utilizan como sustrato (Stichtenoth, *et al.*, 2001).

La COX-1, se encuentra expresada de manera constitutiva en varios tejidos en un nivel constante, aunque difiere según el tejido, se cree que es la enzima asociada con la formación de prostanoides (Miyamoto, *et al.*, 1976; DeWitt, 1991), es la responsable de la acción citoprotectora en tejidos y órganos, semejante a la de la mucosa gástrica y del riñón (Smith, *et al.*, 1995), sus funciones son predominantemente en el retículo endoplásmico y la membrana plasmática, además de participar en las funciones fisiológicas y homeostáticas (Versteeg, *et al.*, 1999). Contrariamente la COX-2 no se detecta en la mayoría de los tejidos, pero se puede inducir su síntesis en altos niveles, después de algunas horas de haber sido estimulado el tejido con sustancias proinflamatorias (Morham, *et al.*, 1995; Vane, *et al.*, 1998).

Aunque los genes que codifican la síntesis de la COX-1 y la COX-2, son distintos e independientes, la reacción enzimática que catalizan es idéntica, debido a la similitud que existe entre ambas isoenzimas en una misma especie y que alcanzan un 60%, aproximadamente en lo estructural y un 90% en el sitio de regulación enzimática (Cryer y DuBois, 1999).

Sin embargo existen importantes diferencias estructurales que determinan la inhibición selectiva de COX por algunos fármacos. Por ejemplo existe una región regulada por los glucocorticoides en el gen de la COX-2. Este efecto es el responsable de la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la enzima COX-2 cuando esta ha sido inducida por citocinas o endotoxinas (Morham, *et al.*, 1995; Appleton, *et al.*, 1996; Cryer, 1999). Los glicocorticoides no afectan la COX-1. Cada isoenzima tiene una localización intracelular diferente, la COX-1 se encuentra principalmente sobre la membrana celular del retículo endoplásmico y en algunas veces alrededor del núcleo. La COX-2 en cambio, se localiza predominantemente en la membrana nuclear y en muy pequeña parte en el citoplasma (Morham, 1995; Appleton, *et al.*, 1996; Cryer y DuBois, 1999).

La mayor parte del conocimiento de esas enzimas, proviene de estudios en los que se les inhibe de manera farmacológica con antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) e inhibidores específicos de COX (Langenbach, *et al.*, 1995; Mahler, *et al.*, 1996). Mahler *et al.*, en 1996, investigaron algunas de las funciones de las isoenzimas en ratones que carecían de los genes *Ptgs 1* y *Ptgs 2*, responsables de la expresión de

las isoenzimas COX-1 y COX-2 respectivamente, encontrando que la COX-1 contribuye en cierto grado al proceso inflamatorio, parto y luteolisis. Además su ausencia no es causa suficiente para el desarrollo de úlceras gástricas. Por otro lado la COX-2 no es esencial para producir una respuesta inflamatoria y participa en la diferenciación celular, mitogénesis y funciones reproductivas específicas. En el cuadro 1 se comparan algunas propiedades de ambas enzimas.

Cuadro 1. DIFERENCIAS ENTRE LA COX-1 Y LA COX-2		
PROPIEDADES	COX-1	COX-2
Ubicación de la enzima	Cromosoma 9q32-33.3 (22 kB)	Cromosoma 1q25.2-25.3 (8,3 kB)
Peso de la proteína	70 Kilo Daltones	72 Kilo Daltones
Función	Manejo fisiológico	Respuesta inflamatoria
Similitud homóloga de aminoácidos en algunas especies (humano, ratón y aves)	60%	60%
Localización intracelular	Membrana del retículo endoplásmico (se mantiene) y en la envoltura nuclear (algunas veces)	Envoltura nuclear (se mantiene), Membrana del retículo endoplásmico (algunas veces)
Regulación	Constitutiva	Inducible
Rango de expresión	De 2 a 4 veces	De 10 a 80 veces
Células, tejidos y órganos en los que se expresa.	Plaquetas, células endoteliales, estómago, riñón, músculo liso, vaso deferente, epidídimo y otros tejidos.	Requiere una estimulación por: Factores de crecimiento, citocinas, promotores de tumores, oncogénesis, carcinogénesis y hormonas. Además de otros tejidos, especialmente células inflamatorias.
Lee, <i>et al.</i> , 1992; Seibert, <i>et al.</i> , 1994; Tsujii, DuBois, 1995; Appleton, <i>et al.</i> , 1996; Cryer y DuBois 1999; Jackson y Hawkey, 2000; Dempke, 2001		

Así mismo, estudios recientes muestran que esta enzima COX-2 se encuentra muy sobreexpresada en varios tipos de cáncer como el colorectal, pulmonar, mamario, de vejiga, hígado, cuello, cabeza, tumores cerebrales, esófago, próstata y riñón, sin afectar la expresión de COX-1 (Hwang, 1998; Fornier, *et al.*, 2000; Fosslien, 2000; Masferrer, *et al.*, 2000; Dempke, *et al.*, 2001).

La sobreexpresión de esta enzima altera la adhesión celular, inhibe la apoptosis y modifica las respuestas de señales reguladoras de crecimiento (Tsuji y DuBois, 1995; Resenberg, 1991), además de mantener una gran correlación con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), el cual es el primero en aumentar en la progresión y displasia del carcinoma (Jablonska, *et al.*, 2002; Shemirani y Crowe, 2002; Chen, *et al.*, 2003).

El modo de acción de la COX-2 en la carcinogénesis, incluye múltiples mecanismos que actúan de diferentes maneras en las enfermedades malignas. Las prostaglandinas juegan un papel muy importante en las neoplasias, especialmente las de la serie E, estas inducen proliferación celular, invasión, angiogénesis y metástasis (DuBois, *et al.*, 1994; Chang, *et al.*, 1999; Shin, *et al.*, 2001) y la autorregulación de la señal de mecanismos de transducción, responsable de mantener las diferentes etapas de la célula y bien comunicación entre célula y célula (Subbaramiah, 1998). La PGE₂ inhibe el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e induce interleucina 10 (IL-10), una citocina con efecto inmunosupresor (Kunel, 1986; Kambayashi, *et al.*, 1995; Stolina, *et al.*, 2000).

Hallazgos recientes reportan la existencia de diferentes enzimas sintasas de prostaglandina E₂ acopladas a cada isoenzima COX. La enzima prostaglandina E sintasa citosólica (cPGES), también denominada p23, esta se expresa en forma constitutiva y ubicua en el citosol de casi todas las células y tejidos, y se ha observado, que se encuentra muy asociada predominantemente con la actividad de COX-1(Tanioka, 2003). En tanto que la enzima prostaglandina E₂ sintasa microsomal 1 (mPGES-1), es una enzima perinuclear asociada fuertemente con las células relacionadas que son inducidas con estímulos proinflamatorios, esta isoenzima mPGES-1, está asociada principalmente con la sobreexpresión de la enzima COX-2. Así mismo reportes recientes evidencian la existencia de una tercera isoenzima microsomal denominada prostaglandina E₂ sintasa microsomal 2 (mPGES-2), es una enzima constitutiva y tiende a elevar su expresión en respuesta a estímulos inflamatorios, promueve la producción de PGE₂ a través de la actividad de las dos enzimas COX-1 y COX-2 (Miyamoto, *et al.*, 2003).

Existen controversias de la actividad de COX-2 y la síntesis de prostaglandinas (Sabine, 2001). Los inhibidores selectivos de la COX-2, son actualmente muy utilizados como efectivos quimiopreventivos y agentes quimioterapéuticos (Grubbs, *et al.*, 2000; Hosomi, *et al.*, 2000; Souza, *et al.*, 2000; Tsubouchi, *et al.*, 2000), los efectos de estos inhibidores específicos de la COX-2 sobre la proliferación de células cancerígenas siguen siendo estudiados. Las bases moleculares de los efectos quimiopreventivos de los NSAIDs, en el cáncer de colon, están siendo atribuidos a la

inhibición de la COX-2, por la susceptibilidad de las células de cáncer de colon a apoptosis (Rigas, 2000).

Dentro de esta familia de inhibidores de la COX-2, se han clasificado en preferentes como el meloxicam, piroxicam, nimesulide y los COXIBS ó específicos donde se engloban los nuevos fármacos mucho más selectivos para esta enzima y que no pierden dicha selectividad a dosis más altas entre ellos se encuentran, el celecoxib (Celebrex) (Figura 1), Refecoxib (Vioxx), Valdecoxib y Parecoxib, caracterizados por presentar dentro de su estructura química una sulfonamida. Ninguno de estos compuestos presenta actividad antiagregante, antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas (Geiss, 1998; Wiholm, 2001; EMEA, 2002; Cruz, 2003).

Los resultados clínicos realizados al celecoxib, han demostrado que poseen ventajas a nivel de seguridad gastrointestinal, agregación plaquetaria y tiempo de sangrado lo que los convierte en buenos candidatos para ser empleados en los pacientes (Hawkey, 1999; Bombardier, *et al.*, 2000; Greemberg, *et al.*, 2000; Silverstein, *et al.*, 2000).

El estudio realizado al celecoxib muestra que se encuentra constituido químicamente por la 4-[5-(4-metil fenil)-3-(trifluoro metil)-1hidro-pirazo-1-ilo] bencenosulfamida, moleciariamente contiene los siguientes compuestos $C_{17}H_{14}F_3N_6O_2$ y tiene un peso molecular de 381.38 g/mol (Figura 1).

En 1998 la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) organismo sanitario de los Estados Unidos que regula los medicamentos en ese país, aprobó el uso del antiinflamatorio celecoxib como medida adicional en el tratamiento estándar de los pacientes con problemas de poliposis adenomatosa familiar (FAP), osteoartritis y artritis reumatoide (Golberg, *et al.*, 1996). Además este inhibidor ha mostrado ser un potente antineoplásico en varios modelos experimentales de cáncer colorectal, pulmón, mama, hígado, cuello, cabeza, esófago, próstata y vejiga, no afectando la expresión de la isoenzima COX-1. En estos estudios se muestran sus potentes propiedades antiproliferativas, antiangiogénicas y apoptóticas (Hwang, *et al.*, 1998; Fornier, *et al.*, 2000; Masferrer, *et al.*, 2000; Dempke, *et al.*, 2001).

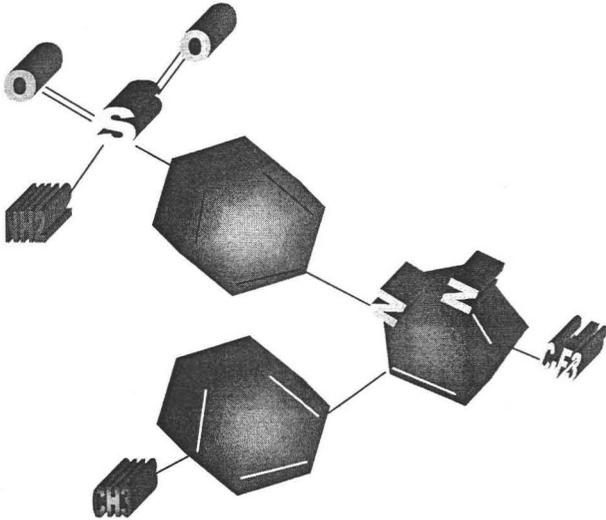


Figura 1. Estructura química del celecoxib.

Los mecanismos de acción para poder elucidar el daño a las células cancerígenas no se conocen aún, sin embargo se proponen dos rutas por las cuales ejerce su afecto, una dependiente y otra independiente de la actividad de la isoenzima COX-2.

Mecanismo dependiente de la actividad de la Ciclooxygenasa 2.

En estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que la expresión de la ciclooxigenasa 2, juega un papel importante en la carcinogénesis y desarrollo del colangiocarcinoma extrahepático, observándose que la proliferación celular se ve abatida al administrar el celecoxib de una manera dosis dependiente, provoca arresto en las fases G_0 - G_1 del ciclo celular en la línea SK-CHA-1, además de mostrar una reducción en la formación de vasos sanguíneos, los cuales suministran nutrientes para el crecimiento y proliferación celular (Jacoby, *et al.*, 2000; Takahashi, *et al.*, 2000; Richter, 2001). En células (de la línea celular SK-Mel-28) de melanoma fueron tratadas con celecoxib, mostrando una disminución dosis dependiente y al ser expuestas con el fármaco en presencia de Prostaglandina E_2 , este prostanoide, permitió a las células revertir el efecto y ayudo a que fuesen rescatadas de la apoptosis de manera proporcional al tiempo de exposición (Denker, C., *et al.*, 2001).

La PGE_2 incrementa la proliferación en las líneas celulares de cáncer de colon y colangiocarcinoma, activando la fosfatidilinositol tres cinasa (PI3K), la cual activa

fosfatidilinositoles bis y tris fosfato (PI₂P y PI₃P respectivamente) la fosforilación de ellos provoca que haya sitios de unión de proteínas como PKB/Akt, la cual fosforila e inactiva proteínas importantes para que se lleve a cabo la apoptosis como, BAD y la Caspasa 9; además la PGE₂ activa la vía del adenilato ciclasa, el cual cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), aumentando sus niveles, este incremento de AMPc, activan la proteína cinasa A (PKA), proteína que estimula la activación del factor transcripcional CREB (CRE-Bending), importante en la transcripción de genes como las ciclinas D y A en la proliferación celular (Takahashi, *et al.*, 2000; Richter, *et al.*, 2001; Sheng, *et al.*, 2001) (Figura 2).

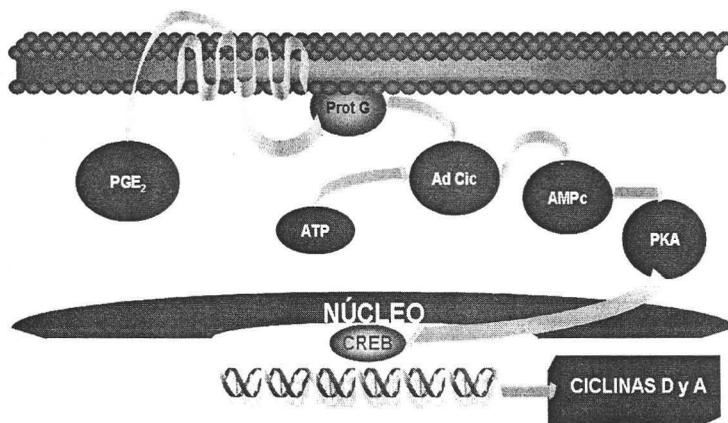


Figura 2. Mecanismo dependiente de COX-2

Tetsuka *et al.*, en 1996, probaron el papel de dos antioxidantes que inhiben la expresión de COX-2 la rotenona y la pirrolidina ditiocarbanoato (PDTTC), observando que las especies reactivas de oxígeno (ROS), juegan un papel importante en la

obtención de PGE₂, debido a que las ROS, ejercen un papel importante, al ser segundos mensajeros y activan rutas importantes en la activación de varias proteínas, el papel que desempeñan las ROS, en la ciclooxygenasa 2, radica principalmente en la peroxidación y endoperoxidación, pasos que son importante en la obtención de prostanoídes importantemente involucrados en la proliferación celular.

Mecanismo independiente de la actividad de COX-2.

Se ha reportado que los NSAIDs provocan cambios en la proliferación celular, retardo en las fases del ciclo celular e inducción de apoptosis, elevando las concentraciones hasta 5000 veces más que las que se necesitan para inhibir la actividad de COX-2 (Manif, *et al.*, 1996; Barnes, *et al.*, 1998; Tsujii, *et al.*, 1998), además de mostrar una reducción en la angiogénesis, metástasis, e inhibición de la proliferación celular (Kawamori, *et al.*, 1998; Sheng, *et al.*, 1998; Hussey y Tisdale, 2000).

Otro estudio donde se empleo celecoxib, se determinó que este inhibidor provoca arresto en el ciclo celular desde una concentración de 50 µM, y lo adjudican a la inhibición de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular como lo son las ciclinas A y B y la cinasa dependiente de ciclinas (Cdk), proteínas esenciales para el paso de la fase G₁ a S, además este inhibidor específico de COX-2, promueve la

activación de p21^{WAF1} y p27^{KIP1} inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas Cdk, bloqueando la entrada a la fase S del ciclo celular y promoviendo la apoptosis (Harper, *et al.*, 1993; Zhang, *et al.*, 1997; Zou y Angles, 1997; Barkett y Glimore, 1999; Bratton, *et al.*, 2000; Grösch, *et al.*, 2001).

Estudios realizados en células de cáncer de colon tratadas con NSAIDs inhiben al factor transcripcional κ B (NF- κ B), esta inhibición provoca arresto e induce la apoptosis (Baeuerle, 1996).

Otros reportes muestran que el gen NF- κ B juega un papel muy importante en la respuesta inmune, desarrollo y crecimiento del linaje celular, apoptosis, inflamación, progresión del ciclo celular, oncogénesis, replicación viral y varias respuestas autoinmunes (Henry, *et al.*, 1999; Lim, *et al.*, 2001).

La activación de NF- κ B está involucrada en gran medida con el estrés, y es activado por una gran variedad de estímulos en los que se incluyen los factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, UV, agentes farmacológicos y otras formas de estrés. En su forma inactiva NF- κ B se encuentra secuestrado en citosol, por los miembros de la familia de proteínas inhibitorias I Kappa B α (I κ B α). Diferentes estímulos son los que activan a NF- κ B, provocando la fosforilación de I κ B α , seguida por la ubiquitinación y su degradación subsecuente.

La familia de proteínas de I κ B α son fosforiladas por el complejo I κ B cinasa constituida por I κ k- α , I κ k- β , I κ k- γ e I κ k- ϵ . El resultado de esta fosforilación expone las señales de localización nuclear (NLS) sobre las subunidades de NF- κ B y la subsecuente traslocación de la molécula al núcleo. En el núcleo, NF- κ B se ancla manteniendo una secuencia (5'-GGGACTTCC-3'), provocando la activación y transcripción de varios genes como c-myc, COX-2, VEGF, ciclinas A, E, D, interleucinas, TNF α , I κ B α , etc. (Figura 3). En células de mamífero se han identificado 5 subunidades de NF- κ B en forma de dímeros (Rel-A (p65), p50, Rel-B, c-Rel y p52). La forma más común y mejor caracterizada de NF- κ B es el heterodímero p50-p65. En cada combinación de los dímeros muestran afinidades distintas en el anclaje y transactivación potencial del DNA (Sen, 1986; Frank, 1999; Egido, *et al.*, 2002).

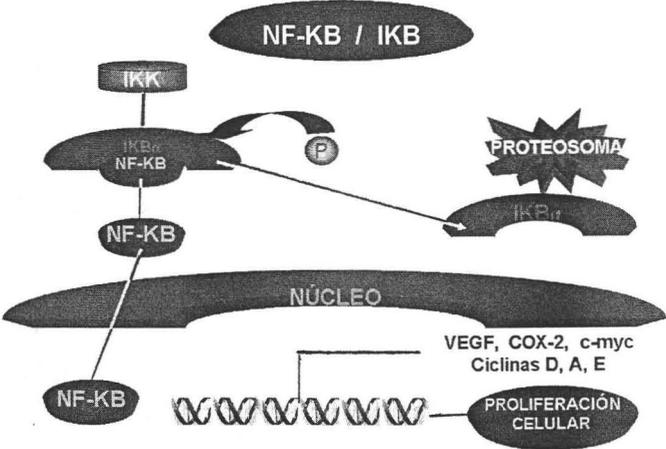


Figura 3. Mecanismo independiente de COX-2, mediado por NF- κ B

Hsu *et al.*, en el 2000 y Sheng y colaboradores en el 2001, encontraron que líneas celulares HCA-7 y PC-3 de cáncer de colon y próstata, respectivamente, sobreexpresan COX-2, células que al ser tratadas con inhibidores de esta enzima como el SC-58125 y NS398, promueven la muerte celular independientemente de la actividad de COX-2.

Observaron que la apoptosis es a través de la inactivación de la proteína antiapoptótica mitocondrial Bcl-2 y por la expresión de la proteína proapoptótica Bax, esta muerte desencadenada por Bax, esta mediada por la activación de la proteína proapoptótica Bid, la cual se fragmenta dejando un extremo carboxilo llamado Bid-truncado (Bid-t), el cual oligomeriza Bax, y provoca su traslocación desde el citosol hasta la membrana externa de la mitocondria donde va a secuestrar e inactivar la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo que permite la liberación del citocromo c de la matriz mitocondrial al citosol el cual se une al dATP y provoca el reclutamiento del factor asociado a apoptosis (APAF-1) con la subsecuente activación de la caspasa 9, la cual provoca la activación de las caspasas efectoras de muerte 3, 6 y 7, las cuales hidrolizan proteínas importantes para la reparación del DNA, como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) y la activación de DNAsas que posteriormente fragmentan el sustrato y/o ácido desoxirribonucleico (ADN). (Harper, *et al.*, 1993; Zhang, *et al.*, 1997; Zou y Anger, 1997; Barkett y Gilmore, 1999; Bratton, *et al.*, 2000; Grösch, *et al.*, 2001). En la siguiente Figura 4, se muestra el mecanismo pictográfico de la actividad de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

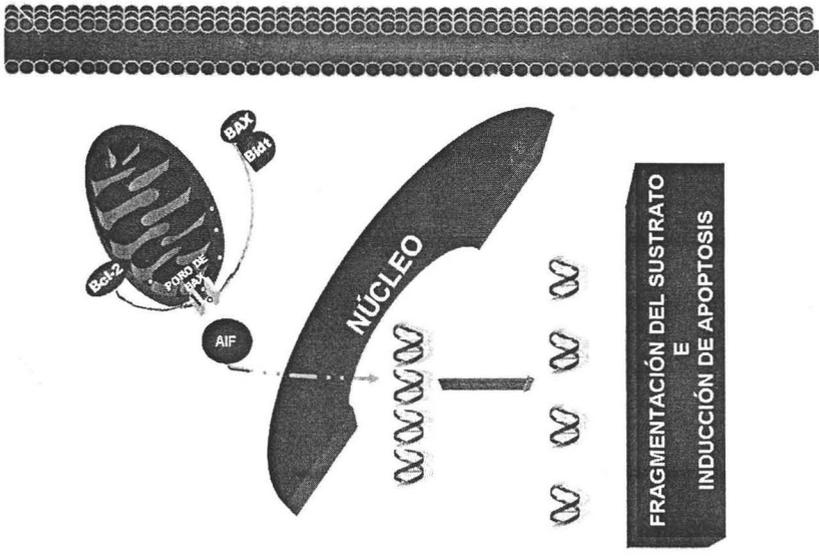


Figura 5. Mecanismo independiente de COX-2 mediado por AIF.

JUSTIFICACIÓN

De los tumores malignos el 2 % corresponde a neoplasias primarias del sistema nervioso central, con una incidencia de 5-8/100,000 (De Angelis 2001).

A pesar de intensas investigaciones, tanto el glioblastoma multiforme como el astrocitoma anaplásico, continúan siendo resistentes a cualquier tratamiento quirúrgico, radioterapia, quimioterapia sistémica o local, así como a inmunoterapia.

Estudios epidemiológicos han reportado que a partir del diagnóstico la sobrevivencia del paciente es menor a un año, pese a los diversos tratamientos. Estudiar la fisiopatología e identificar tratamientos alternativos es de vital importancia.

En experimentos *in vitro* e *in vivo*, se ha mostrado que el Celecoxib, inhibidor específico de la Ciclooxygenasa 2, promueve la muerte celular en células de poliposis adenomatosa familiar (cáncer de colon), cuando son sometidas las células con este compuesto, sin embargo otros trabajos muestran que cuando el fármaco es administrado en presencia de prostaglandina E₂ (PGE₂), las células son rescatadas de la apoptosis.

Se sabe que la PGE₂ es un metabolito importante que se obtiene del metabolismo del ácido araquidónico, mediado por la ciclooxigenasa, y participa de manera

importante en las fases del ciclo celular, además de activar rutas bioquímicas principales, que permiten la transcripción de genes que son importantes para la proliferación celular, favoreciendo de esta manera la supervivencia de la célula.

Por estos motivos y conociendo el hecho de que el Celecoxib vislumbra como un potente antineoplásico para el tratamiento del cáncer de cualquier tipo u origen, el presente trabajo pretende elucidar cuál es el mecanismo de acción del Celecoxib y los posibles mecanismos moleculares que ocurren durante la apoptosis, en cultivos de la línea celular glioma C6 de rata *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto del celecoxib sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el glioma maligno experimental C6 de rata *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia de COX-2 en la línea celular glioma C6 de rata por Western blot.

- Valorar el efecto del celecoxib sobre la proliferación celular en el glioma C6 de rata *in vitro* por Metil tetrazolium.

- Determinar los posibles mecanismos moleculares por los cuales el celecoxib ejerce su efecto proapoptótico con las técnicas de Western blot, Doble Tinción, Anexina 5, Citometría de flujo y Electroforesis.

HIPÓTESIS

- Si el celecoxib induce apoptosis, en la línea celular glioma C6 de rata *in vitro*, este efecto se observará inhibido en presencia de Prostaglandina E₂ (PGE₂), de no ser así, será a través de un mecanismo independiente de la actividad de COX-2, mediante la posible inactivación del factor transcripcional NF-κB y/o de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

METODO

Para la elaboración de este estudio, fue importante determinar la sobreexpresión de COX-2 en la línea celular glioma C6 de rata, de esta manera se justificó el uso de este inhibidor selectivo de la isoforma COX-2 sobre el glioma C6 de rata, isoforma ampliamente implicada en procesos proliferativos.

Para lo cual se realizó lo siguiente:

Determinación de los niveles de la enzima COX-2 por Western blot

Los cultivos de la línea celular glioma C6 de rata, se lisaron y se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford, bajo condiciones desnaturalizantes, las proteínas fueron separadas en geles SDS/ PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubaron las membranas con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y se incubaron con un anticuerpo secundario peroxidado a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se lavaron con PBS-Tween y se revelaron por quimioluminiscencia. Los niveles de expresión de la enzima COX-2, se normalizaron con su β -actina, empleando un análisis densitométrico.

Purificación del celecoxib

Se adquirió el celebrex (celecoxib) comercialmente en presentación de cápsulas de 200 mg, se obtuvo el polvo blanco de la cápsula, se agitó en cloroformo (CHCl_3) durante una hora, se separó por filtración, obteniendo dos porciones una fracción sólida, que es vehículo, esta porción se desechó y la solución clorofórmica que contiene el celecoxib, la cual se evaporó por un sistema de rotavapor a 60°C , para la obtención del celecoxib, el compuesto obtenido se sometió a resonancia magnética nuclear de protones ^1H , mediante los desplazamientos químicos y multiplicidad de la señal, con la cual se analizó dicho compuesto.

Efecto del celecoxib sobre las células de glioma C6 de rata

Se utilizaron células de glioma C6 de rata, obtenidas de American Tissue Culture Collection (Rockville MD), clonadas en un tumor glial de rata inducido con N-nitrosometilurea. Fueron cultivadas en un medio Dulbelco modificado, suplementado con suero fetal bovino al 10%, mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Para conocer el efecto del celecoxib sobre la línea celular, se formaron grupos de cultivos del glioma C6 de rata: aquellos que no recibieron tratamiento, cultivos tratados con 50, 75 y 100 μM de celecoxib disuelto en Dimetil

sulfóxido (DMSO), cultivos tratados con las diferentes dosis de celecoxib en presencia de prostaglandina E₂ (10⁻⁶ y 10⁻⁸ M) disuelta en DMSO, y cultivos tratados con DMSO a las mismas dosis antes mencionadas de los diferentes tratamientos, observando el efecto a las 2, 4 y 6 horas posteriores al tratamiento. Todos los grupos se mantuvieron bajo las condiciones de un medio séptico.

Ensayo de viabilidad celular.

Para determinar cuantitativamente la viabilidad celular todos los cultivos fueron tratados con las sales de tetrazolium (MTT) a una concentración de 10µM, este colorante es hidrolizado a cristales de formazán púrpura por células metabólicamente activas (Hansen, 1989), 4 horas después de incubación, se agregaron 100 µl de la solución solubilizadora, posteriormente se cuantificó el formazán por medio de un estudio colorimétrico utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda entre 540 nm.

Determinación de Apoptosis.

La determinación del efecto apoptótico del celecoxib sobre la línea celular glioma C6 de rata, se utilizó la técnica de Western blot, analizando los niveles

de expresión de la proteínas antiapoptótica y proapoptótica Bcl-2, la activación de la Caspasa 3, hidrólisis de PARP y actividad de PCNA.

Para la extracción de DNA genómico, se realizó mediante el método de AquaPure Genómico DNA (Biorad), el cual fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y visualizado con luz ultravioleta, para determinar su integridad o patrón de escalera, observado en células apoptóticas, de cada uno de los cultivos (controles y tratados con las diferentes dosis de celecoxib, celecoxib más PGE₂ y DMSO) después de cada período de incubación.

Para conocer el porcentaje de células apoptóticas, se empleo la técnica de anexina V/ yoduro de propidio para lo cual, se toman 4×10^5 células de cada uno de los tratamientos control y tratadas, se lavan con PBS 1X, se centrifugan a 3000 rpm minuto, el botón celular, se homogeniza con 5 μ l buffer de unión + 10 μ l de yoduro de propidio, se incuba en la oscuridad por 20 minutos, posteriormente se lavan las células 2 veces con PBS 1X y se analizan con el citómetro de flujo.

La manera de conocer las fases del ciclo celular, en las que se encuentra la célula, es usual tomar una cantidad de 4×10^6 de células control y tratadas, se centrifugan y fijan durante toda noche con etanol al 70% a 4°C, se lavan con PBS por 3 ocasiones, posteriormente, se incuban 1 hora con 1mg/ml de RNAasa y 20 μ g/ml de yoduro de propidio a temperatura ambiente, para analizar con el citómetro de flujo.

Para la determinación de apoptosis por la técnica de doble tinción naranja de acridina-bromuro de etidio, se prepara una mezcla maestra en una proporción 1:1 de los dos reactivos, se cuantifican un total de 5×10^5 y/o 1×10^6 células, en cada pozo, se adiciona de 1 - 3 μ l de la solución stock, se homogenizan las células cuidadosamente para no desprenderlas, y rápidamente se observan en el microscopio de fluorescencia para observar el tipo de daño generado en cada una de ellas.

Determinación de los mecanismos moleculares.

Para conocer si el efecto proapoptótico del celecoxib es mediante un mecanismo dependiente o independiente de la actividad de COX-2, se determinaron en cada uno de los cultivos, los niveles de expresión de las proteínas de la Ciclooxygenasa 2, Bcl-2, I κ B α proteína inhibitoria del factor transcripcional NF-kB, mediante las técnicas de Western blot antes descritas.

Análisis estadístico

Para comparar las diferentes variables (viabilidad celular, apoptosis, niveles y las diferentes proteínas) entre los diferentes grupos experimentales se utilizaron las pruebas estadísticas de "t" de Student.

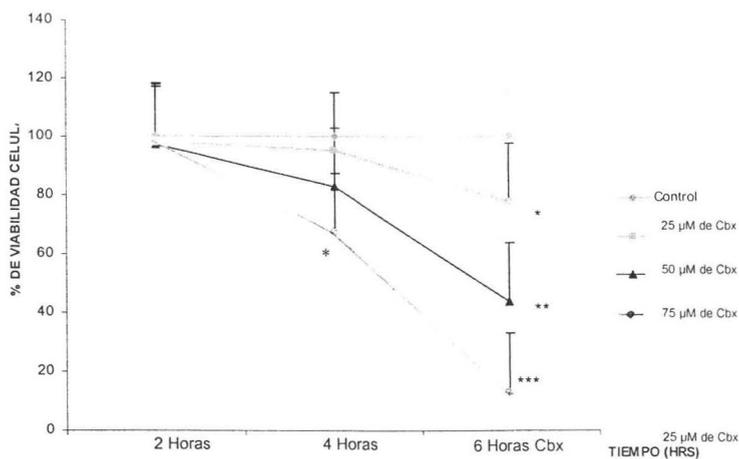
RESULTADOS

VIABILIDAD CELULAR POR ENSAYOS DE METIL TETRAZOLIUM (MTT)

La medición de la viabilidad celular por metil tetrazolium (MTT), permite conocer el porcentaje de células viables, después de haber sido tratadas con algún compuesto, las células aún vivas, introducen el MTT a su interior y por reacciones enzimáticas generadas en la mitocondria reducen el MTT hasta cristales de formazán, virando de un tono amarillo a un color púrpura.

En este experimento se encontró que las células tratadas con celecoxib, después de 6 horas de tratamiento, con una concentración de 25 μ M, muestra poca disminución en la viabilidad celular (3%), cuando se duplica la concentración a 50 μ M, el porcentaje de células muertas aumenta hasta un 33%, cuando se utilizan concentraciones altas de celecoxib de 75 μ M, disminuye la viabilidad celular de manera muy significativa ($p < 0.001$), alrededor del 87%, durante el periodo de tratamiento.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos al medir la viabilidad celular en células tratadas con celecoxib a distintas dosis de concentración.



Prueba "t" de Student *p< 0.05, ***p< 0.01, ****p< 0.001

Figura 6. Efecto del celecoxib sobre la viabilidad celular.

EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), permite observar cuando la célula se encuentra viva y en división, si la expresión de esta proteína aumenta, sirve como un marcador que indica que la célula se encuentra metabólicamente activa. En este experimento se observó que la proteína PCNA, manifiesta en mayor cantidad en las células control y en las tratadas con dimetil sulfóxido y celecoxib, disminuye significativamente la expresión de PCNA, de manera proporcional al tiempo de exposición, lo cual sugiere que la gran mayoría de células se encuentran arrestadas en alguna de las fases del ciclo celular o bien están ya se encuentran muertas. En la Figura 7 se muestra la expresión de PCNA después de haber sido tratada con celecoxib.

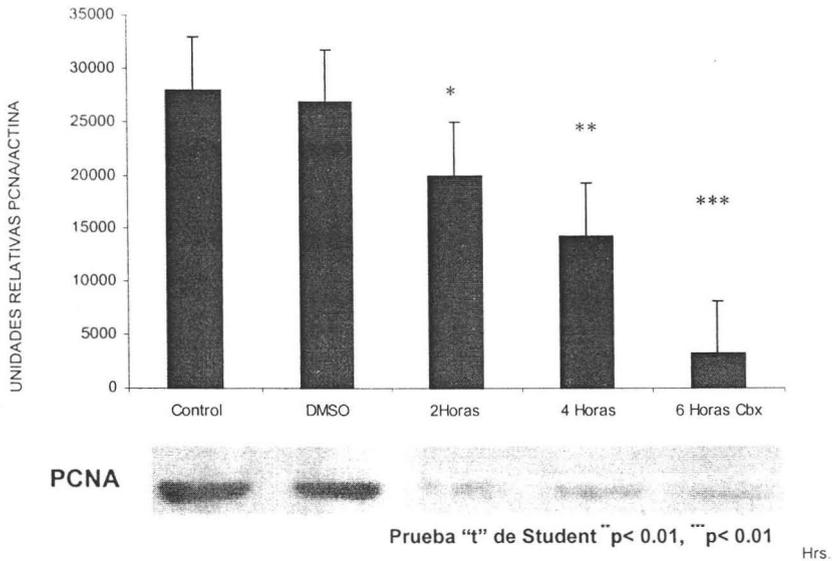


Figura 7. Western blot de PCNA con 75µM de celecoxib.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR DOBLE TINCIÓN (NARANJA DE ACRIDINA-BROMURO DE ETIDIO)

Una de las maneras de comprobar de manera visual, si la muerte celular es mediada por apoptosis o necrosis, es a través de técnica de la doble tinción (naranja de acridina-bromuro de etidio), la naranja de acridina, es una molécula muy pequeña, propiedad que le permite atravesar la membrana plasmática y teñir tanto núcleo de color verde intenso, como citoplasma de un verde más tenue, observándose un color verde cuando las células están vivas, de un verde intenso los núcleos que han sido fragmentados y dañados, esto último es característica propia de la apoptosis temprana y cuando la muerte es por

necrosis, la célula se hincha y explota, liberando todo su contenido al espacio extramembranal, provocando daño en las células vecinas o adyacentes, esta ruptura en la membrana, permite la entrada del bromuro de etidio, el cual es una molécula grande y que solo puede incorporarse cuando la membrana plasmática está fragmentada, tiñendo el núcleo por la unión a las histonas y no histonas de un color rojo intenso.

En este experimento se observó, que la muerte celular es mediada primero por la apoptosis en un 30%, cuando las células son tratadas con una concentración de $50\mu\text{M}$ de Cbx, pero cuando se eleva la concentración a $75\mu\text{M}$ de Cbx, el daño, se eleva y provoca que la célula entre a apoptosis y rápidamente le siga la muerte necrótica, como una respuesta de la célula a ser exterminada rápidamente, observándose en este experimento que la muerte celular se manifestó en un 70% del total de las células, siendo un 35% las células apoptóticas y un 45% necróticas. Cuando las células fueron tratadas con DMSO no presentaron ninguna disminución en la muerte celular después de 6 horas de tratamiento a ninguna de las dos dosis 50 y $75\mu\text{M}$. En la figura 8 se muestran las fotografías del efecto generado por el compuesto sobre las células C6 de rata, vistas a 100X.

A. MORFOLOGÍA CELULAR



CONTROL



APOPTOSIS



NECROSIS

B. TRATAMIENTOS:

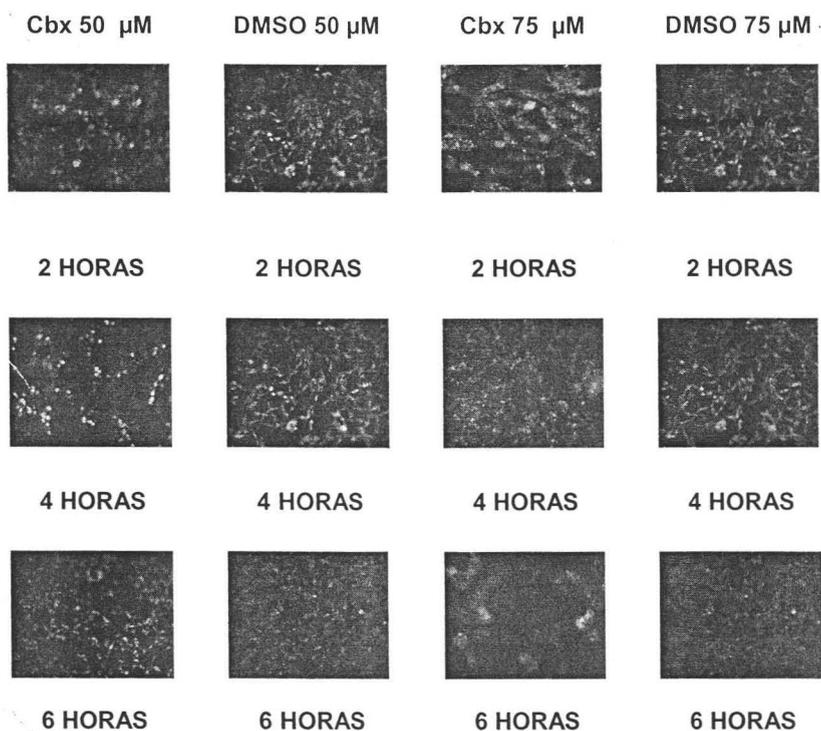


Figura 8. Doble tinción naranja de acridina-bromuro de etidio

PRUEBA DE ANEXINA 5

Existen evidencias que prueban que la inducción del poro de transición de permeabilidad, el cual puede liberar calcio de la matriz mitocondrial al citosol, un evento que puede llevar primero a la activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, hacia la muerte celular por necrosis (Kass y Orrenius, 1999). Esta es una manera de cerrar, la relación existente entre apoptosis y necrosis,

esta es dependiente de la dosis y posiblemente de la reversibilidad del poro de transición (Bonfoco, *et al.*, 1995). Diferentes grupos de investigadores sugieren que estos mecanismos de muerte celular pueden ocurrir (Dyrbukt, *et al.*, 1995; Majno, *et al.*, 1995; Raffray, *et al.*, 1997; Nacarawa, *et al.*, 1998; Halestrap, *et al.*, 1999).

En este experimento se observó, que la muerte celular es debida a la acción de proteasas que conllevan a apoptosis primeramente, de manera significativa; a medida que incrementa el tiempo de exposición disminuyen las células vivas y aumentan las apoptóticas, esto es observado, cuando las células son tratadas con una concentración de 50µM de celecoxib. Cuando se incrementa la concentración a 75µM, se observan los dos tipos de muerte celular: apoptótica en primer lugar, seguida de una muerte necrótica; siendo la más frecuente la muerte por necrosis cuando se deja expuestos los cultivos celulares por periodos largos de 6 horas, esto asociado, como una acción que toma la célula, para acelerar su destrucción. En la Tabla 1 y 2 se muestran los valores obtenidos de la Media ± la desviación estándar.

ANEXINA 5 CON 50 µM DE CELECOXIB				
Tratamiento (Hrs)	% de Necrosis	% de Apoptosis Tardía	% de Vivas	% de Apoptosis Temprana
Control	2.47	13.7	82.17	1.61
1	0.1 ± 0	0.17 ± 0	73.84 ± 0	25.89 ± 0
2	4.6 ± 0	2.23 ± 0	72.35 ± 0	20.82 ± 0
3	6.15 ± 0	16.61 ± 0	68.99 ± 0	8.25 ± 0
4	5.94 ± 0.084	27.67 ± 8.64*	61.18 ± 9.404	5.16 ± 0.905
5	6.285 ± 5.437*	34.1 ± 11.02*	52.92 ± 14.23*	6.695 ± 2.227*
6	5.135 ± 4.136*	34.73 ± 1.781	51.68 ± 3.832	8.46 ± 2.093*

Prueba "t" de Student *p < 0.05

Tabla 1. Prueba de Anexina 5 con 50µM de celecoxib.

ANEXINA 5 CON 75 μ M DE CELECOXIB				
Tratamiento (Hrs)	% de Necrosis	% de Apoptosis tardía	% de Vivas	% de Apoptosis temprana
Control	3.72	14.69	79.96	0.81
1	23.67 \pm 7.96	28.19 \pm 10.9	41.47 \pm 3.38	6.7 \pm 0.47
2	47.785 \pm 3.63	13.875 \pm 9.21	32.53 \pm 18.67	1.305 \pm 0.54
3	37.745 \pm 5.10*	24.59 \pm 8.27*	28.815 \pm 3.16*	3.63 \pm 1.05*
4	39.16 \pm 3.02*	39.065 \pm 0.03*	20.695 \pm 0.37*	2.32 \pm 0.47*
5	54.905 \pm 0.37*	25.295 \pm 3.33*	18.725 \pm 0.99*	1.875 \pm 0.16*
6	70.51 \pm 0.72*	31.54 \pm 18.6*	12.64 \pm 3.52*	2.31 \pm 2.66*

Prueba "t" de Student *p< 0.01

Tabla 2. Prueba de Anexina 5 con 75 μ M de celecoxib.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo, permite observar daños generados en la célula, agruparlos y mostrar el tipo de muerte celular que ha sufrido, mostrando porcentajes de cada una de las fases en las cuales se encuentra cada una de ellas. En la tabla 3, se muestran los resultados encontrados en la citometría, cuando fue utilizada una concentración de 50 μ M, afirman que la mayor parte de las células, se encuentran en la fase de G₀ y G₁, lo cual indica, que la mayor parte de las células, se encuentran reparando el daño que les ha provocado el compuesto durante el tiempo de exposición, la cantidad de células que se encontraban en la fase de S, es baja, comparada a la que se encuentra en la fase de G₂ esta fase nos permite observar que las células que se encontraban en esa fase lograron ser dañadas y que les generó tal daño, que en la fase G₂, quedaron arrestadas, por tanto no lograron pasar a la otra fase del ciclo celular, es decir a la mitosis, observándose así, que las células se encontraban en esa fase, se encontraban reparando el daño generado al ADN.

ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO CON 50 μ M DE CELECOXIB					
Tiempo (Hrs)	Tratamiento	% de Apoptosis	% de G ₀ -G ₁	% de S	% de G ₂ -M
1	Cbx	1.23 \pm 0.042	64 \pm 0.18*	20.6 \pm 0.15*	3.05 \pm 0.66
1	Cbx + PGE2	0.51 \pm 0.61	72.2 \pm 1.62*	19.6 \pm 1.37*	2.88 \pm 0.48
2	Cbx	4.37 \pm 1.43*	54.9 \pm 1.75*	25.6 \pm 0.12*	7.92 \pm 0.80*
2	Cbx + PGE2	2.46 \pm 0.67	66.6 \pm 3.09*	21.5 \pm 0.91*	3.66 \pm 0.37
3	Cbx	5.64 \pm 3.03*	55.4 \pm 2.9*	27.1 \pm 0.73*	6.86 \pm 1.03*
3	Cbx + PGE2	1.81 \pm 0.87	61.9 \pm 0.88*	25.7 \pm 1.68*	5.88 \pm 0.09*
4	Cbx	4.74 \pm 1.94*	50.9 \pm 0.40*	30.4 \pm 2.18*	6.61 \pm 0.40*
4	Cbx + PGE2	1.62 \pm 0.37	63.2 \pm 4.43*	24.8 \pm 2.27*	5.56 \pm 0.47
5	Cbx	5.53 \pm 0.39*	54.6 \pm 1.33*	25.5 \pm 0.32*	6.50 \pm 1.38*
5	Cbx + PGE2	2.29 \pm 0.58	62.3 \pm 7.65*	24.4 \pm 4.33*	5.56 \pm 0.55
6	Cbx	17.9 \pm 2.11*	39.3 \pm 2.08*	34.2 \pm 0.25*	5.01 \pm 0.45
6	Cbx + PGE2	5.42 \pm 2.41*	58.7 \pm 1.12*	25.33 \pm 0.76*	5.71 \pm 1.35*

Prueba "t" de Student *p< 0.05, **p< 0.01

Tabla 3. Resultados de citometría de flujo.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR ELECTROFORESIS (PATRÓN DE ESCALERA) CON UNA CONCENTRACIÓN DE 75 μ M DE CELECOXIB

El patrón escalera de DNA (electroforesis), permite observar la fragmentación del material genético de células después de haber sido expuestas a fármacos, estos rompimientos van desde los 150 a 200 pares de bases ó múltiplos de estos, cuando la célula, presenta daño de este tipo, la muerte celular se asocia que es mediada por apoptosis.

En este experimento se observó que las células control y tratadas con DMSO a una concentración de 75 μ M después de 2, 4 y 6 horas no muestra daño alguno en su material genético, lo cual sugiere que este compuesto no daña a la célula y que el efecto es atribuido a el celecoxib.

Una de las muestras más culminantes en la muerte por apoptosis es a través de la observación del patrón de escalera del ADN, en este experimento, se observa que desde las primeras 2 horas de exposición, las células en presencia con celecoxib a una concentración de 75µM, muestran una degradación considerable, de manera proporcional al tiempo de exposición, lo cual sugiere, que la célula, ya se encuentra muerta. En la Figura 9 se muestra el efecto del compuesto después de 6 horas de exposición en las células.

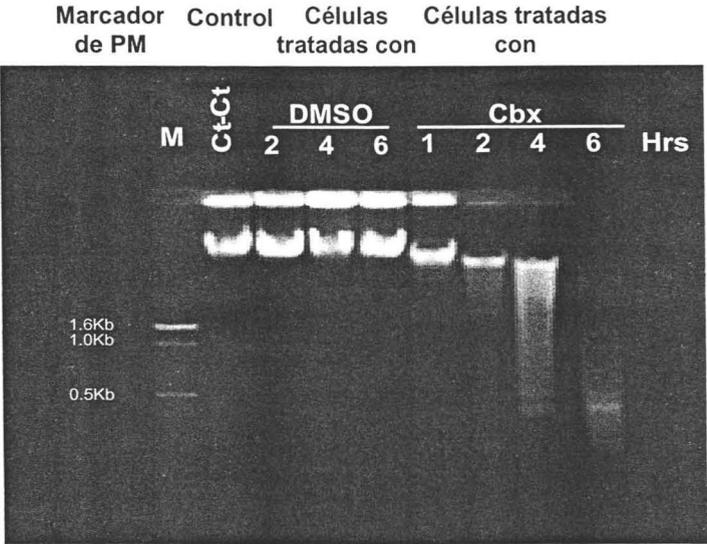


Figura 9. Patrón de escalera de ADN.

EXPRESIÓN DE LA PROCASPASA-3

Son una familia de enzimas con trece miembros que tienen en común la presencia de cisteína en su centro activo y que efectúan el corte en el

aminoácido Aspartato (Cisteinil-ASPartato específico-proteASAS). Durante la apoptosis se promueve la activación de proteasas, que inician la degradación de las proteínas de filamentos intermedios de la matriz nuclear. Se cree que debido a que la cromatina se encuentra adosada a estos sitios, la fragmentación de los mismos promueve la desorganización de la cromatina (Peitsch, *et al.*, 1994; Jun, *et al.*, 1998). La activación posterior de endonucleasas que tienen accesos a las regiones de ADN entre los nucleosomas lo hidrolizan. Su fragmentación se considera como un elemento diagnóstico de la muerte celular por apoptosis.

Las caspasas son probablemente las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis, contribuyen de manera importante a través del desensamble de la estructura celular, como lo ilustra la destrucción de la lámina nuclear, que es una estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear y está implicada en la organización de la cromatina (Weil, 1996). La lámina está formada por polímeros de proteínas filamentosas intermedias. Durante la apoptosis las proteínas son derivadas a un sitio único por las caspasas, causando el colapso de la lámina y contribuyendo a la fragmentación de la cromatina (Samali, 1999). La regulación de estas caspasas da cuenta de una característica espectacular de estos sistemas: mantienen a la proteasa efectora inactiva pero en respuesta de cantidades mínimas de un inductor apropiado, son capaces de activar grandes cantidades de ésta rápidamente.

En este experimento se observó la expresión de la procaspasa 3, debido a que solo la forma inactiva puede ser observada, ya que esta cuando es activada

bajo algún estímulo disminuye su expresión de procaspasa para activarse en forma de caspasa, en las células control y tratadas a una concentración de 75µM de DMSO, la expresión de la procaspasa 3 está muy marcada, lo que indica que no se está activando, cuando las células son tratadas con una concentración de 75µM de celecoxib, la expresión va disminuyendo pero la actividad está aumentando, proporcional al tiempo de exposición, lo que indica que la muerte celular es mediada por la actividad de caspasas. En la Figura 10 se muestra la expresión de la procaspasa 3 en células de glioma C6 de rata.

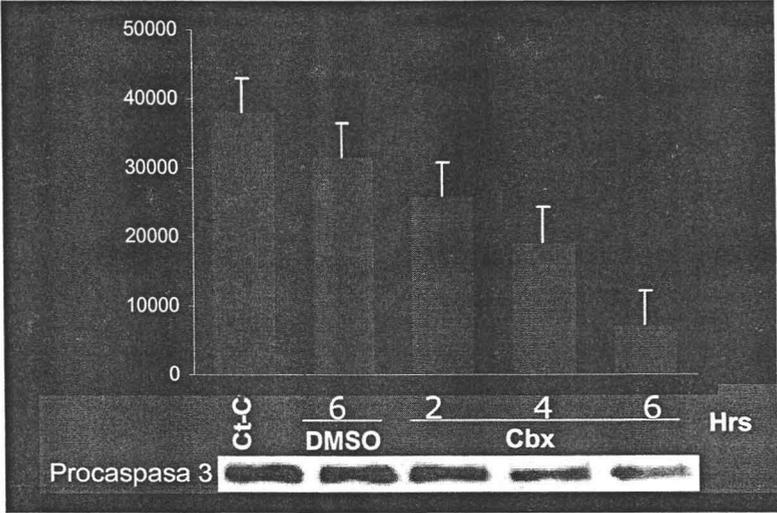


Figura 10. Gráfica de la expresión de procaspasa 3

EXPRESIÓN DE LA POLI ADP RIBOSA POLIMERASA

La poli ADP ribosa polimerasa (PARP) es una proteína de reparación de ADN, y se observa en mayor proporción cuando el material genético ha sufrido

modificaciones que afectan la transición en el paso de una fase a otra del ciclo celular, esta rápidamente incrementa sus niveles para reparar todo el daño.

En este experimento se observó que la PARP, se encuentra presente en mayor proporción en las células control y células tratadas con DMSO después de 6 horas de exposición. Cuando las células son tratadas a una concentración de 75µM de celecoxib los niveles aumentan después de 2 horas de tratamiento, tratando de reparar el daño, a medida que va transcurriendo el tiempo, la presencia de esta proteína va disminuyendo, de tal manera que a las 6 horas de exposición es tanto el daño que la proteína no puede repararlo lo que puede deberse a que la célula está ya muerta. En la Figura 11 se muestra la expresión de la proteína PARP.

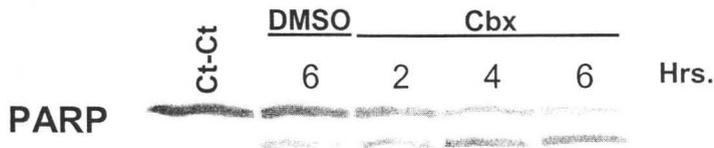


Figura 11. Western blot de la proteína PARP.

EFFECTO DE LA PGE₂ SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN CELULAS GLIOMA C6 DE RATA

La PGE₂, es un prostanoide producto del ácido araquidónico, que participa de manera importante en la activación de proteínas que están involucradas en los procesos de las fases del ciclo celular. Participa de manera importante en el rescate celular, sus altos niveles permiten la proliferación celular.

En este experimento se determinó el mecanismo de acción de dicho prostanoides observándose, que en las células tratadas con 25µM de celecoxib, muestran un 4% de apoptosis y 50 µM de Cbx, disminuye hasta un 33%, y cuando se someten en presencia de prostaglandina E₂, no muestran disminución en la viabilidad celular, esto es debido a que las células son expuestas con el fármaco son rescatadas en un 100% de la apoptosis en ambas concentraciones. Cuando las células son tratadas una concentración de 75µM, se observa una disminución de la viabilidad celular en 87% y cuando son expuestas las células con esa misma concentración más PGE₂, se observa que la viabilidad celular disminuye hasta un 86% de manera dosis dependiente. En la Figura 12 se muestra gráficamente el efecto que genera el celecoxib y celecoxib + PGE₂.

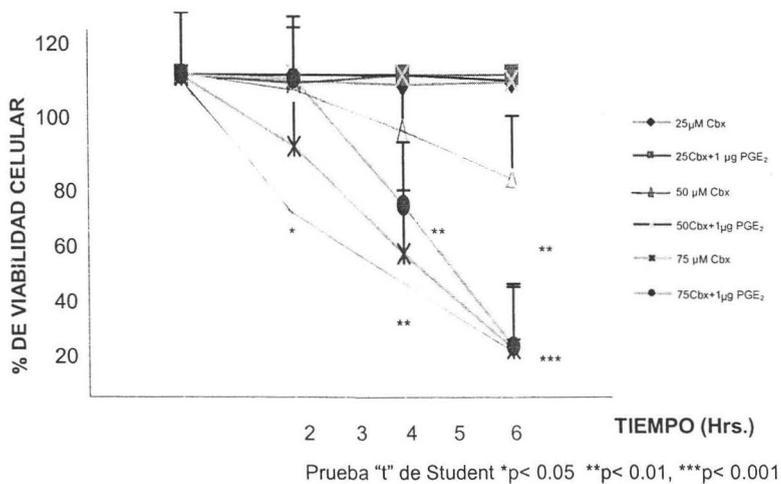


Figura 12. Efecto de la PGE₂ sobre la actividad antiproliferativa del celecoxib en la línea celular glioma C6 de rata.

NIVELES DE EXPRESIÓN DE Bcl-2

Bcl-2 es un miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas mitocondriales, la sobreexpresión de esta proteína ha sido considerada como un factor que impide o retarda la apoptosis, cuando ésta es inducida por algunos factores como las radiaciones γ , los glucocorticoides, el choque térmico, la quimioterapia y la exposición a radicales libres. La expresión de la proteína Bcl-2 también ha sido observada en células malignizadas y, por consiguiente, ha sido relacionada con la oncogénesis y, además, con la protección del tejido neoplásico que recibe radiaciones o quimioterapia.

La sobreexpresión de Bcl-2 es un hallazgo constante en muchas leucemias, linfomas y tumores sólidos. Aparentemente, Bcl-2 parece funcionar como un antioxidante e inhibe la apoptosis alterando el flujo de calcio hacia los organelos intracelulares. Otros trabajos han encontrado pruebas de que Bcl-2 inhibe el transporte de la proteína p53 hacia el núcleo de las células.

En este trabajo se observó, que los niveles del gen expresado en la proteína Bcl-2, no disminuyeron después de haber sido tratadas con DMSO y celecoxib con de 6 horas de tratamiento, indicando que el experimento es independiente de la actividad de Bcl-2, sugiriendo que la apoptosis observada no esta influenciada por la actividad de esta proteína.

En la Figura 13, se graficó la expresión de la proteína, después de haber tratado las células con celecoxib durante 6 horas.

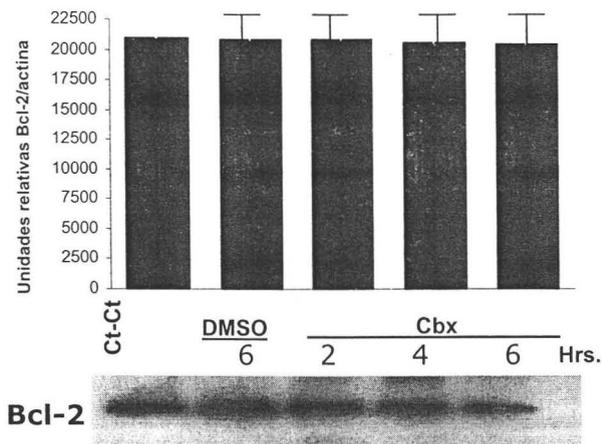


Figura 13. Niveles de expresión de la proteína Bcl-2.

NIVELES DE EXPRESIÓN DE NF-kB

Este factor transcripcional NF-kB es importante, ya que permite la transición de una fase a otra del ciclo celular, a través de la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular como lo es la misma transcripción de COX-2, VEGF, Ikb α , la transcripción de este último, permite que de manera negativa pueda mantenerse la expresión de NF-kB, a través de la degradación de la proteína Ikb α , liberando NF-kB y de esta manera mantenga una respuesta que estimule el rescate celular.

Los resultados obtenidos muestran que las células expuestas a altas concentraciones de celecoxib, aumentan significativamente los niveles de Ikb α con respecto a los controles, sugiriendo la inhibición de NF-kB, mediante su

concentración citosólica. En la Figura 14, se muestra el Western blot y la gráfica de la expresión de IκBα, después de haber sido tratadas las células con una concentración de 75μM de celecoxib.

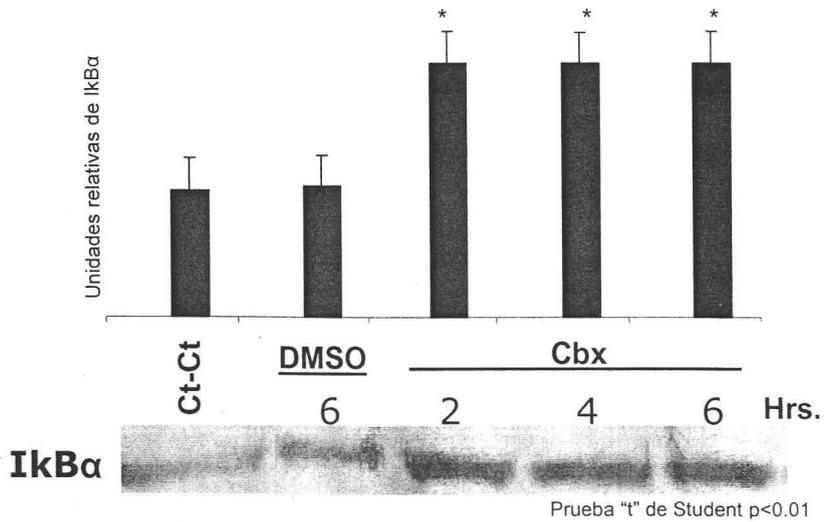


Figura 14. Niveles de expresión de la proteína IκBα.

DISCUSIÓN

Los gliomas malignos, son los tumores cerebrales primarios más frecuentes, causan globalmente el 2% de las muertes por cáncer. A pesar de intensas investigaciones, tanto el glioblastoma multiforme como el astrocitoma anaplásico, continúan siendo resistentes a cualquier tratamiento: quirúrgico, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia sistémica o local (Zamora y Espinosa, 1994; DeAngelis, 2001; Molina, *et al.*, 2002).

Estudios epidemiológicos han reportado que a partir del diagnóstico la supervivencia del paciente es menor a un año, pese a los diversos tratamientos. Estudiar la fisiopatología e identificar tratamientos alternativos es de vital importancia.

El celecoxib es un fármaco que está siendo empleado como un quimiopreventivo en el tratamiento de poliposis adenomatosa familiar (cáncer de colon) en pacientes que presentan este mal. Este compuesto celecoxib, es un inhibidor específico de la ciclooxigenasa 2, esta enzima se ha encontrado sobreexpresada en varios tipos de cáncer como el colorectal, pulmonar, mamario, de hígado, cabeza, cuello tumores cerebrales, esófago, próstata y vejiga, su modo de acción en el papel de la carcinogénesis incluye múltiples mecanismos que actúan de maneras distintas en las enfermedades malignas. La inhibición de esta isoenzima, por la acción de NSAIDs, provoca una disminución en la producción de las prostaglandinas, estos prostanoides, especialmente las de la serie E, inducen proliferación, invasión,

angiogénesis y metástasis, además de regular la señalización de mecanismos de transducción, responsables de mantener las etapas del ciclo celular. En base a esto podemos asumir que las prostaglandinas participan de manera importante en crecimiento celular y además, juegan un papel importante en la inflamación a través de la activación de proteínas, que participan de manera importante en proliferación celular y su inhibición permite la inhibición de la angiogénesis, progresión celular y favorece el que se lleve a cabo la apoptosis (Black, 1995; Plate y Risau, 1995; Samoto, *et al.*, 1995; Lundal, *et al.*, 1998; Wallace, 1998; Bikfalvi, 1999; Euchenhofer, 1998; Plate, 1999).

Sin embargo existen controversias hasta la fecha en torno al rol de acción de cada enzima de ciclooxigenasa como responsable de la síntesis de prostaglandinas, debido a que diferentes estudios muestran que ambas isoenzimas participan de manera independiente, en respuesta a la administración de algún agente externo, que altera de manera importante la supervivencia celular (Grubbs, *et al.*, 2000; Hosomi, *et al.*, 2000; Souza, *et al.*, 2000; Tsubouchi, *et al.*, 2000).

Existen evidencias que prueban que la apoptosis es mediada por dos mecanismos distintos por inhibición directa de la enzima COX-2 y por mecanismos independientes de su actividad (Stichtenoth, *et al.*, 2001

Los resultados encontrados en el presente trabajo mostraron una disminución baja en la viabilidad celular en células C6 después de haber sido tratadas con 25 μ M de

celecoxib y mostró un aumento en el cuando fueron expuestas con 50 μ M, y redujo de manera muy significativa hasta un 87% la viabilidad celular, después de haberse aumentado la concentración a 75 μ M de celecoxib después de 6 horas de tratamiento, resultados similares fueron encontrados en células QBC939 de colangiocarcinoma, donde se comprobó el potente efecto que genera a nivel celular este inhibidor en diferentes modelos de cáncer, este compuesto, inhibe la multiplicidad del tumor intestinal en un 71% comparado con los grupos control (Jacoby, *et al.*, 2000; Takahashi, *et al.*, 2000; Wu, 2003).

El daño generado por el tratamiento en las células, permite observar la inactivación de proteínas importantes, que permiten la sobrevivencia de la célula, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que tiene como finalidad expresarse cuando la célula se encuentra en división y se observa que su expresión disminuye en comparación al control después de 6 horas de exposición, infiriéndose que la célula ya se encuentra muerta y otra como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) la cual se activa cuando la célula sufre daño en el material genético y se muestra en sus niveles más altos de expresión para reparar el daño generado en el DNA, viéndose que después de 2 horas de tratamiento la PARP está muy activa, pero disminuye su actividad significativamente después de 6 horas de estar en presencia de celecoxib, lo cual nos indica que la célula se encuentra muy dañada y no es posible el poder reparar su daño ella misma (Bratton, *et al.*, 2000; Grösch, *et al.*, 2001), esta inactivación de estas proteínas, permite el suicidio celular y la activación de proteínas que conlleven a cabo toda la

cadena de muerte y que inicia con la activación de proteasas responsables de la fragmentación del sustrato, como caspasa ejecutora de muerte 3, en este experimento, se observó una disminución en la expresión de la procaspasa 3, característica que indica, que está activándose la caspasa 3, de manera proporcional al tiempo de exposición y comparadas con el grupo control, sugiriendo que esta proteasa es una de las responsables de la fragmentación del DNA.

En este estudio se observó la degradación del material genético y una manera es por patrón de escalera de DNA, cuando las células fueron expuestas con 75µM de celecoxib, se observó, que desde la primera hora ya existe degradación en el material genético y esta fractura en el material genético, es proporcional al tiempo de exposición del fármaco, después de 6 horas de tratamiento, todo el DNA está fragmentado, característica de que se está llevando a cabo muerte celular mediada por apoptosis.

La técnica de la doble tinción naranja de acridina-bromuro de etidio, comprobó de manera visible, que en estas células dañadas, incorporaron una mayor cantidad de naranja de acridina, en el núcleo, tiñéndolo el DNA que ha sido fragmentado de un color verde más intenso en comparación a las células control, en ambas concentraciones probadas 50 y 75µM de celecoxib, ese color observado indicó que la mayor parte de las células se encontraban en una etapa de apoptosis temprana y cuando se incrementa la concentración a 75 µM de celecoxib, las

células muertas presentan núcleos rojos, lo cual indica, la fractura de la membrana plasmática y la subsecuente incorporación del bromuro de etidio, característica de una muerte mediada por necrosis.

Cuando se determinó la viabilidad celular por MTT, las células son tratadas con una concentración de 25, 50 y 75 μ M de celecoxib, genera una disminución en la proliferación celular de manera proporcional al tiempo de exposición y cuando son expuestas a las mismas concentraciones más 1 μ M de PGE₂, las células en las primeras concentraciones 25 y 50 μ M de celecoxib son rescatadas de la apoptosis, sugiriendo que es un mecanismo dependiente de la actividad de la ciclooxigenasa 2, solo a bajas concentraciones del compuesto y al elevar la concentración del celecoxib a 75 μ M más 1 μ M de PGE₂, las células no logran sobrevivir a pesar de tener el prostanoide en el medio, el cual le permite poder revertir la apoptosis, lo cual indica que el daño es tanto que la célula no es capaz de repararlo y prende otros mecanismos para poder sobrevivir, actuando como un mecanismo independiente la actividad de la ciclooxigenasa 2.

Existen evidencias que prueban que la inducción del poro de transición de permeabilidad, puede liberar Ca²⁺ de la matriz mitocondrial al citosol, un evento que puede conllevar primero el acompañamiento de la activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, hacia la muerte celular por necrosis (Kass, 1999; Arrenius, 1999). Esta es una manera de cerrar, la relación existente entre apoptosis y necrosis, esta es dependiente de la dosis y posiblemente de la

reversibilidad del poro de transición (Bonfoco, 1995). Diferentes grupos de investigadores sugieren que estos mecanismos de muerte celular puede ocurrir (Dybbukt, 1995; Majno, 1995; Raffray, 1997; Nacarawa, 1998; Halestrap, 1999).

Los resultados obtenidos de la prueba de Anexina V se observó, que la muerte celular es debida por la acción de proteasas que conllevan a apoptosis primeramente, de manera significativa a medida que incrementa el tiempo de exposición disminuyen las células vivas y aumentan las apoptóticas, esto es observado, cuando las células son tratadas con una concentración de 50 μ M de celecoxib y se observan las dos muertes celulares, la apoptótica seguida de una muerte necrótica cuando se incrementa la concentración a 75 μ M de celecoxib, siendo la más observada la muerte por necrosis como una acción que toma la célula para acelerar su suicidio.

El estudio realizado de citometría de flujo en células C6 de glioma de rata, muestra que el celecoxib a una concentración de 50 μ M inhibe la proliferación celular e induce apoptosis por una supresión en la producción de PGE₂, y además provoca arresto, acumulando la mayor cantidad de células en la fase G₁, debido a que se encuentran reparando el daño que se ha generado por el compuesto y en la fase S del ciclo celular, las acumula de tal manera que las células que se encontraban en esa fase, no pueden pasar a la fase G₂, ya que se encuentran check points, los cuales se encargan de corroborar que no existe ya ningún daño en todo el material genético, y las células que no fueron capaces de reparar el daño, se encuentran

en una etapa de muerte celular. A pesar de que las células tienen el metabolito que permite la recuperación celular, las células se concentraban en su mayoría en las mismas fases, reparando el daño generado en ellas. En células QBC 939 de colangiocarcinoma de colon, se encontraron resultados muy similares, donde el celecoxib, provoca de igual manera, arresto en las fases G₀/G₁ del ciclo celular.

La expresión de Bcl-2 en este experimento no variaron después de haber sido tratadas las células con celecoxib, estos resultados muestran que el mecanismo es independiente de la actividad de Bcl-2, resultados similares se encontraron en el modelo experimental de cáncer de próstata. En esa línea celular se atribuye la inducción de apoptosis a la inactivación de la proteína Akt, independiente de la actividad de Bcl-2.

El factor transcripcional NF-κB, puede actuar a través de una transcripción negativa, su observación es difícil, puede observarse su actividad a través de IκBα, en este experimento, las células tratadas con altas dosis de Cbx se encontraron niveles muy altos de la proteína IκBα en comparación con el grupo control.

Este hallazgo sugiere que uno de los posibles mecanismos de acción involucra la posible inactivación del factor transcripcional NF-κB, ya que este factor transcripcional tiene la capacidad de actuar de distintas maneras y de estar involucrado en muchos eventos en la célula, la actividad de este factor

transcripcional, está asociado de manera importante con el crecimiento celular, y su inactivación favorece que la célula pueda reconocer los daños que ha sufrido y repararlos, tardándose el tiempo necesario para que una célula pueda terminar con su ciclo de vida y no tenga que estar dividiéndose descontroladamente.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la apoptosis generada por el celecoxib, es dependiente de la actividad de COX-2, solo a bajas concentraciones (25 y 50 μM), debido a que las células en presencia de celecoxib + PGE_2 , son rescatadas de la apoptosis en un 100%.

Así mismo cuando se utilizan concentraciones altas de celecoxib y estas son expuestas en presencia de PGE_2 , permite que no exista rescate en las células de la apoptosis, lo cual sugiere que el celecoxib, actúa ejerciendo su efecto apoptótico a través de los dos mecanismos moleculares dependiente e independiente de la actividad de COX-2.

La apoptosis observada en la línea celular glioma C6 de rata es independiente de la proteína antiapoptótica Bcl-2. En el modelo experimental de cáncer de próstata se han encontrado resultados similares. En esa línea celular se atribuye la inducción de apoptosis a la inactivación de la proteína Akt, independiente de Bcl-2.

En las células tratadas con altas dosis de celecoxib, se encontraron niveles más altos de la proteína I κ B α en comparación con el grupo control. Este hallazgo sugiere que uno de los posibles mecanismos de acción involucra la posible inactivación del factor transcripcional NF- κ B.

REFERENCIAS

1. Appleton I, Tomlimson A. 1996. Induction cyclooxygenase and nitric oxide synthase inflammation. *Adv. Pharmacol*; 35: 27-78.
2. Arrieta O, García E, Guevara P, García-Navarrete R, Ondarza R, Rembao D, Sotelo J. 2002. Hepatocyte Growth Factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and it is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer*. 135: 562-573.
3. Arrieta O, Guevara P, Reyes S, Palencia G, Rivera E, Sotelo J. 2001. Paradoxical Effect Of Aspirin On The Growth Of C6 Rat Glioma And On time Of Development Of ENU- Induced Tumors Of The Nervous System. *J Can Res and Clin oncol*. 127(11): 681-686.
4. Barkett M. Gilmore T. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene*. 18: 6910-6924.
5. Barnes CJ, Cameron IL, Hardam WE, Lee M. 1998. Non-steroidal anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *Br. J. Cancer*. 77: 573-580.
6. Baeuerle PA, Baltimore D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 87(1):13-20.

7. Black PM. 1995. Brain tumors. *NEJM* 342: 1471-1476.

8. Bikfalvi A. 1999. Role of fibroblast growth factor-2 in tumor angiogenesis. *Pathology biological.* 47: 364-367.

9. Bombardier C, Laine L, Golstein JL. 2000. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal antiinflammatory drugs for osteoarthritis and reumatoid arthritis. The CLASS study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 284: 1247-1255.

10. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(16):7162-6.

11. Bratton SB, Cain K, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem.* 275: 6067-6070.

12. Chang CC, Lee FY, Wang SS, Chang FY, Lin HC, Chu CJ, Tai CC, Lai IN, Lee SD. 1999. Effects of vasopressin on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of nitric oxide and prostaglandin. *Hepatology.* Sep; 30(3):630-5.

13. Chen L, He H, Mondejar EF, Hedenstierna G. 2003. Cyclooxygenase inhibitor blocks rebound response after NO inhalation in an endotoxin model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* H290-8.
14. Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, Ji XD, Wang D, Shih CC, Arap W, Huang CM, Cavence WK. 1996. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8502-8507.
15. Cruz C. 2003. Aines vs Coxibs en dolor perioperatorio. *Rev. Col. Anest.* 31: 189-193.
16. Cryer B, DuBois A. 1999. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase: a review. *Prostaglandin Lipid Mediat.* 56: 341-361.
17. D'Amore PA et al. 1999. Angiogenesis. *Science & Medicine.* 6: 44-53
18. DeAngelis LM. 2001. Brain tumors. *New Englander. Journal Medical* 2: 114-123.
19. Dempke, C. Rie, A. Grothy, H-J. Schmoll. 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 411-417.

20. Denkert, C., Köbel, M., Berger, S., Siegert, A., Leclere, A. Trefzer, U., Hauptmann, S. 2001. Expression of Cyclooxygenase 2 in Human Malignant Melanoma. *Cancer Research*. 61, 303-308.

21. DeWitt D. L. 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*. 1083: 121-134.

22. Dypbukt JM, Ankarcrona M, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. (4):961-73.

23. DuBois, R. N., Awad, J., Morrow, J., Roberts, L. J., and Bixhop, P. R. 1994. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester. *J. Clin. Invest.* 110: 493-496.

24. Egido P, Bonazzola P, Marengo FD, Savio-Galimberti E, Ponce-Hornos JE. 2002. Lithium and KB-R7943 effects on mechanics and energetics of rat heart muscle. *Acta Physiol Scand*. 176:1-11.

25. EMEA public statement on parecoxib sodium. 2002. Risk of serious hypersensitivity and skin reactions. London. EMEA 25175/02.

26. Evans, S. C., Viswamathan, M. Grier JD Narayana, M., 2001, *Oncogene* 20; 4041-4049.

27. Folkman J. 1995. Clinical applications of research on angiogenesis. *NEJM* 333: 1757-1763.

28. Fosslien E. 2000. Molecular Pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30: 3-21.

29. Fornier M, Esteva FJ, Seidman AD. 2000. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 27(6 Suppl 11):38-45; discussion 92-100. Review.

30. Frank O. 1999. Outcomes of an educational-outreach service for community medical practitioners: non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Med J.* 171:388-389.

31. Geiss HK. 1998. Recommendations for surgical therapy planning and interventions in patients with AIDS *Chirurg.* 69(5):503-10. Review. German.

32. Golberg Y, Nassif II, Pitas LL, Dylanch bd, Rigas B, Shiff SJ. 1996. The anti-proliferative effect of sulidanc and sulidanc sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene.* 12: 893-901.

33. Greemberg HG, Gottesdiener K, Huntington M. 2000. A new cyclooxygenase 2 inhibitor, refecoxib (VIOXX), did not alter antiplatelet effects of low dose aspirin in healthy volunteers J Clin Pharmacol 40: 1509-1515.
34. Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam and Geisslinger G. 2001. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. J Faseb 15: 2742-2744.
35. Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steel VE, Kelloff GL, Hill DL, Seibert K. 2000. Celecoxib inhibits N-butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fisher-344 rats. Cancer Res. 60: 5599-55602.
36. Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR. 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 mitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem. 273(21):12901-8.
37. Guerin C, Laterra J. 1997. Regulation of angiogenesis in malignant glioma. EXS. 79: 47-64.
38. Halestrap A. P.; Hu B. R. 1999. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. Biochem Soc Symp. 66:181-203.
39. Hansen W R, J. A. Keelan, S. J. Skinner, M. D. Mitchell. 1999. Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism coordinate regulation of

expression by cytokines in gestational tissues: a review, Prostaglandins
otherlipid. *Mediat.* 57 243-257.

40. Harper DG, Blaydes JE Jr, Kelley EP, Walt JG, DeGryse RE, Novack
GD. 1993. Flurbiprofen 0.03% for the control of inflammation following cataract
extraction by phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 19(4):481-7.

41. Hawkey C, Rohan G. 1999. COX-2 inhibitors. *Lancet* 353: 307-314.

42. Henry RE, Versteeg, Paul MP, Van-Bergen, Sander JH, Van-Deventer
M. 1999. Cyclooxygenase-dependent signalling: molecular events and
consequences. *FEBS Letters.* 445(1): 1-5.

43. Holgate S. T. Twentyman O. Rafferty P. 1987. Primary and secondary
effector cells in the pathogenesis of bronchial asthma, *Int. Arch. Allergy Appl.
Immunol.* 82: 498-506.

44. Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y,
Ochiai A. 2000. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs
frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung
Cancer.* 30(2):73-81.

45. Hsu AL. Ching T. Sheng D, Song X. Rangnekar V. 2000. The
cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt
activation in human prostate cancer cells. 275: 11397-11403.

46. Hussey HJ, Tisdale MJ. 2000. Effect of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on tumour growth and cachexia in a murine model. *Int J Cancer*. 87(1):95-100.

47. Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. 1998. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 90(6):455-60.

48. Hwang D, Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Meydani SN. 1998. Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol*. 275 (3 Pt 1):C661-8.

49. Jablonska E, Jabionski J, Holownia A, Iwaszkiewicz-Pawlowska A, Piotrowski L, Kiluk M, Grabowska SZ, Markiewicz W. 2002. TNFRs and IL-6R transmembrane receptors expression and release of their soluble forms by neutrophils and mononuclear cells from cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst*. 46:113-25.

50. Jackel MC, Mitteldorf C, Schweyer S, Fuzesi L. 2001. Clinical relevance of Fas (APO-1/CD95) expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. (8):646-52.

51. Jackel MC, Sellmann L, Youssef S, Dorudian MA, Fuzesi L. 2001. Prognostic significance of expression of p53, bcl-2 and bax in squamous epithelial carcinoma of the larynx--a multivariate analysis. HNO. (3):204-11. German.

52. Jackson LM, Hawkey CJ. 2000. COX-2 Selective Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Do They Really Offer any Advantages?. Drus. 59: 1207-1216.

53. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. 1996. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. J Cell Biol. (5):1041-51.

54. Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. 2000. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. Cancer Res. 60(18):5040-4.

55. Jensen RL. 1998. Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review. Surg. Neurol. 490: 189-195.

56. Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. 1998. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. J Clin Invest. (1):176-83.

57. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. 1995. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol.* 154(7):3383-90.

58. Kakiuchi Y, Tsujii, Tsujii M, Murata H, Hawai N, Yasumaru M, Kimura A, Kamori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki y, Hayashi N, Kawano s, Hori M. 2002. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer res* 62: 1567-1572.

59. Kass GE, Orrenius S. 1999. Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 1:25-35. Review.

60. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. 1998. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 58(3):409-12

61. Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J. 1986. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun.* 137(1):404-10.

62. Langembach R, Morham SG, Tiano GH, Lofthim CD, Ghanayem BI Chulada PC. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidic acid inducen inflammation and indemethacin induced gastriculceration. *Cell* 83: 483-492.

63. Lee, S. H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhoong, H., Liou, S., Simmons, D., and Hwang, D. 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolisaccharide. *J. Biol. Chem.* 267, 25934-25938.

64. Lim JW, Kim H, Kim KH. 2001. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase -2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab. Inv.* 81(3): 343-360.

65. Lundal EL, Spang TM, Skovgaard PH, Kristjansen PEG. 1998. Tumor angiogenesis a new therapeutic target in gliomas. *Acta Neurol. Scand.* 97: 52-62.

66. Mahler JF, Davis BJ, Morham SG, Langembach R. 1996. Disruption of cyclooxygenase genes in mice. *Toxicol Phatol.* 24: 717-719.

67. Majno PE, Licker M, Kadry Z, Buhler L, Morel DR, Morel P. 1996. Effect of dopamine, norepinephrine, and prostaglandin-E1 on graft perfusion in small bowel transplantation in pigs. *Transplant Proc.* (5):2549-50.

68. Manif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff Rigas B. 1996. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol.* 52:237 245.

69. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifl BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moorre RJ, Seibert K. 2000. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase 2 inhibitors. *Cancer Res.* 60:1306-1311.

70. Miller C, Zhang M, He Y, Zhao J, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Di Battista JA. 1998. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. *J Cell Biochem.* 69(4):392-413.

71. Miyamoto T, N. Ogino, N. Yamamoto, S. and Hayaishi, O. 1976. purification of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* 251; 2629-2636.

72. Miyamoto K, Suzuki H, Yamamoto S, Saitoh Y, Ochiai E, Moritani S, Yokogawa K, Waki Y, Kasugai S, Sawanishi H, Yamagami H. 2003. Prostaglandin E2-mediated anabolic effect of a novel inhibitor of phosphodiesterase 4, XT-611, in the in vitro bone marrow culture. *J Bone Miner Res.* (8):1471-7.

73. Molina J., Schumacher HR Jr, Boice JA, Daikh DI, Mukhopadhyay S, Malmstrom K, Ng J, Tate GA. Randomised double blind trial of etoricoxib and indometacin in treatment of acute gouty arthritis. *BMJ.* 2002; 22:1488-92.

74. Morham SG, Langembach R, Loftin CD, Tiano HG, Voloumanos N, Jennette JC et al. 1995. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83: 473-482.

75. Moriyama T, Kataokova H, Tsubouchi H, Koono M. 1995. Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells in vitro. *FEBS Lett.* 372(1): 78-72.

76. Moriyama T, Kataoka H, Hamasuna R, Yokogami K, Uehara H, Kawano H, Goya T, Tsubouchi H, Koono M, Wakisaka S. 1998. Up-regulation of vascular endothelial growth factor induced by hepatocyte growth factor/scatter factor stimulation in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 249(1):73-7.

77. Moriyama M. 1999. Development of diffuse invasive (grade 4D) human oral squamous cell carcinoma model in severe combined immunodeficiency mice: microangiarchitectural analysis and immunohistochemical study. *Oral Oncol.* (4):395-400.

78. Nakazawa K, Kalassy M, Sahuc F, Collombel C, Damour O. 1998. Pigmented human skin equivalent--as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. *Med Biol Eng Comput.* (6):813-20. Review.

79. Okazaki t, Sogawo N, Okita JR, Bleasdal JE, McDonald PC, Johnston JM. 1981. Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua Vera. *J Biol Chem.* 256: 7316-7321.
80. Peitsch MC, Mannherz HG, Tschopp J. 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* (2):37-41.
81. Plate K, Risau W. 1995. Angiogenesis in malignant glioma. *GLIA.* 15: 339-47.
82. Plate KH. 1999. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exper Neurol.* 47: 364-367.
83. Prescott SM, Majerus PW. 1983. Characterization of 1,2 diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of arachidonyl-monoacyl-glycerol intermediate. *J Biol Chem.* 258: 764-769.
84. Raffray M, Cohen GM. 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther.* (3):153-77. Review.
85. Richter M, Weiss M, Weinberger I, Furstenberger G, Marian B. 2001 Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis.* (1):17-25.

86. Rigas B, Shiff SJ. 2000. All children in developing countries will be affected by AIDS, not just orphans. *AIDS Anal Afr.* 6(3):8-9.

87. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. 1991. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 83(5):355-8.

88. Sabine B, Mayr B, Bode H, Schmitz H, Schulzke JD, Fromm M, Lochs H. 2001. Effects of endotoxin on human large intestine. *Ann N Y Acad Sci.* 915:264-6.

89. Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. 1999. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell.* 40(2):321-6.

90. Samoto K et al. 1995. Expresión of vascular Growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer res.* 55: 1189-1193.

91. Sánchez J. A. Dawn A. Bradbury, Linhua Pang, Alan J Knox. 2003 Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer.* 40: 33-44.

92. Seibert K., ZhangY, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W. *et al.* 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role

Cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 13313-13318.

93. Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergun S, Stavron D, Rosen EM, Lamszus K. 1999. Levels of Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/ scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. Int J Cancer. 84(1): 10-8.

94. Sen R, Baltimore D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell. 47(6):921-8.

95. Shemirani B, Crowe DL. 2002. Hypoxic induction of HIF-1alpha and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma lines is mediated by stress activated protein kinases. Oral Oncol. (3):251-7.

96. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. 1998. Modulation of apoptosis and expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res. 58: 362-366.

97. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. 2001. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J.Biol. Chem. 276:18075-18081.

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

98. Shin SS, Noh MS, Byun YJ, Choi JK, Kim JY, Lim KM, Ha JY, Kim JK, Lee CH, Chung S. 2001. 2,2-Dimethyl-4,5-diaryl-3(2H) furanone derivatives as selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 11(2):165-8.

99. Silverstein FE, Faich G, Golstein JL. 2000. Gastrointestinal toxicity with celecoxib and nonsteroidal antiinflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The CLASS study: a randomized controlled trial *JAMA* 284: 1247-1255.

100. Smith WL. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am J Physiol.* 268: F181-F191.

101. Smith W. L., D. L. DeWitt, M. G. Garavito. 1995. Cyclooxygenases: structure, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69 145-182.

102. Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60:5767-5772.

103. Stichtenoth, L. J. Crofford, Thoren H. Peters Golden. 2001. Microsomal prostaglandin synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol.* 167:469-474.

104. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. 2000. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* 164:361-70.

105. Strugar JG, Crisculo GR, Rothbart D, Harrington WN. 1995. Vascular endothelial growth factor expression in human glioma specimens: correlation with vasogenic brain edema and tumor-associated cyst. *J. Neurosurgery.* 83: 682-689.

106. Sumitani K, Kamijo r, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. 2001. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via supresión of prostaglandin E₂ production. *J Oral Pathol Med.* 30: 41-47.

107. Takahashi S, Fujita T, Yamamoto A. 2000. Role of cyclooxygenase-2 in *Helicobacter pylori*- induced gastritis in Mongolian gerbils. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: 791-798.

108. Tanioka T, Nakatani Y, Kobayashi T, Tsujimoto M, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I. 2003. Regulation of cytosolic prostaglandin E₂ synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:1018-1023.

109. Tetsuka T, Baier D and Morrison A. 1996. Antioxidants inhibit interleukin-1 induced cyclooxygenase and nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells. *J Biol Chem*. 271: 11689-11693.

110. Tsubouchi Y, Mukai S, Kawahito Y, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Sano H. 2000. Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 20: 2867-2872.

111. Tsujii M., DuBois RN. 1995. Alteration in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells over expressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell*. 83: 493-501.

112. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 93: 705-716.

113. Vane J. R. 1995. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol*. 231: 232-235.

114. Vane JR, Vane RY, Botting RM. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 38: 97-120.

115. Versteeg H, Bergen P, Henegouwen S, Deventer M. 1999. Cyclooxygenase dependent signalling: molecular events and consequences. *FEBS Letters* 445: 1-5.

116. Wiholm B. 2001. Identification of sulfonamide like adverse to celecoxib in the World Health Organization database. *Curr Med Res Opin.* 17: 210-216.
117. Zamora J., P, Espinosa E. 1994. Factores pronósticos en Oncología. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España. 1-21.
118. Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA. 1997. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol.* 273(6 Pt 2):F994-1002.
119. Zou M, Anger C. 1997. Cell-cell interaction between platelets and IL-1 beta-stimulated vascular smooth muscle cells in synthesis of thromboxane A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 56(2):85-91.