



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFECTO DE LA ERITROPOYETINA  
RECOMBINANTE HUMANA SOBRE  
LA MUERTE DE CÉLULAS DE  
CARCINOMA CERVICAL  
INDUCIDA POR QUIMIOFÁRMACOS  
DE DISTINTA ACCIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**MARÍA JOSÉ VÁZQUEZ-MELLADO  
PETIT**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Datos del Jurado**

### **1.- Datos del alumno**

Vázquez-Mellado

Petit

María José

53 93 16 00

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

403054561

### **2.- Datos del tutor**

Dra.

Leticia

Rocha

Zavaleta

### **3.- Datos del sinodal 1**

Dr.

Emilio

Rojas

Del Castillo

### **4.- Datos del sinodal 2**

Dr.

Gerardo

Ramos

Mandujano

### **5.- Datos del sinodal 3**

M. en C.

Perla Mariana

Del Río

Estrada

### **6.- Datos del sinodal 4**

M. en C.

María Guadalupe

Ordaz

Téllez

### **7.- Datos del trabajo escrito**

Efecto de la Eritropoyetina recombinante humana sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción.

117 p

2009

**A Dios, a mis padres y a todos  
los que padecieron, padecen  
y padecerán cáncer....**



## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios...**

Por nunca, NUNCA dejarme...

### **A mi tutora, mis sinodales y profesores...**

A la Dra. Leticia Rocha por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su enorme paciencia y por enseñarme no sólo a ser mejor investigadora, si no también a como ser mejor ser humano...

A los Doctores Gerardo Ramos y Emilio Rojas, a la Dra. Perla del Río y a la Maestra Guadalupe Ordaz por todas las horas que le dedicaron a la revisión de mi trabajo, por las valiosas correcciones y sugerencias que me hicieron...

Al profesor y compañero Gerardo Rivas por enseñarme el mágico mundo de la Bioestadística...

### **A mi familia...**

A mis papás... por todo... por ser mis papás, por educarme, por ayudarme, por acompañarme, por hacerme tal y como soy...

Pa: Gracias por tu protección, apoyo, comprensión... Por dejarme y sobre todo ayudarme a alcanzar todos mis sueños... Me dices pocas cosas, pero lo que me dices, se queda en mi corazón y me ayuda a ser mejor y mas fuerte cada día...

Ma: Gracias por... por todo... Amor, dulzura, compañía, amistad, comprensión, paciencia, ayuda... Por estar ahí siempre, por entenderme...

A mis tias "Verillo" y "Bernarda"... Por aguantarme !!!, por quererme...

A mi cuary, por las travesuras, las risas...

A mis abuelitos...

Por los genes, por escucharme, por guiarme, por iluminarme y nunca dejarme sola...

### **A mis amigos...**

A Bocha, por toda su ayuda, por las risas, por los paseos, pero sobre todo, por su amistad sincera y verdadera... Por ayudarme... Por escucharme...

A Michelle, Rey y Ceci, por su amistad... por compartir conmigo carcajadas e historias... Por ayudarme y acompañarme en momentos de estrés y hacerlos menos duros...

A Perla, por todos esos años de risa... Por hacer mis primeros años en esta carrera más fáciles...

### **A mis compañeros...**

A Ceci, por su compañerismo, por enseñarme como demonios tratar a un ratón atímico !!! pero sobre todo, por compartir conmigo locuras y risas...

A Liz: Por las crepas, el Dr. House y distracciones en momentos difíciles...

A Eve: Por su compañerismo, las platicas, los cigarritos, los cafecitos, los anillos y demás joyas !!! y en fin, las distracciones...

A Vale: Por su ayuda más de una vez...

Al resto...

### **A T.H, M.S, A.R, R.F y X.M...**

Por la motivación, la emoción, el ejemplo de que sí se puede y la distracción... Y por hacer de mi vida algo especial...

### **A Perr y Ani...**

Por su compañía y dulzura incondicional... Por enseñarme que la vida se vive día a día, sin rencores...

### **A los que estuvieron aquí el día de mi titulación...**

Por acompañarme en este día tan especial e importante para mi... Y por los aplausos !!!! 😊

Los quiero mucho y los llevaré en mi corazón siempre !!!!

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 CÁNCER CERVICOUTERINO.....	2
1.2 MUERTE CELULAR.....	3
1.2.1 Necrosis.....	4
1.2.2 Apoptosis.....	4
1.2.3 Autofagia .....	9
1.2.4 Catástrofe mitótica.....	13
1.2.5 Senescencia .....	16
1.3 QUIMIOFÁRMACOS.....	18
1.3.1 Cisplatino.....	18
1.3.2 Paclitaxel.....	20
1.3.3 Doxorubicina.....	20
1.3.4 Tamoxifén.....	21
1.4 ANEMIA.....	23
1.5 ERITROPOYETINA.....	25
1.5.1 Eritropoyetina recombinante humana.....	28
1.5.2 Eritropoyetina y su receptor en biopsias de tumores	28
1.5.2.a Eritropoyetina y su receptor en tumores del	
tracto genital femenino.....	29
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
5.1 LÍNEAS CELULARES Y QUIMIOFÁRMACOS.....	34
5.2 DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS LETALES DE LOS	
QUIMIOFÁRMACOS.....	34
5.3 PRUEBA DE MTT.....	35
5.4 ENSAYOS DE PROTECCIÓN CON ERITROPOYETINA.....	35
5.5 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA...	36
5.6 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE JAK 2.....	36

5.7 ENSAYOS DE RESISTENCIA.....	36
5.8 ENSAYOS DE TUNEL.....	37
5.9 ENSAYOS DE INCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO.....	38
5.10 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR CISPLATINO Y DOXORUBICINA IN VIVO..	39
5.11 DETERMINACIÓN DE LA CASPASA 3 ACTIVA.....	40
5.12 ENSAYOS DE DETECCIÓN DE SENESCENCIA.....	41
5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
<b>VI. RESULTADOS</b>	
6.1 DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS LETALES 50 DE LOS QUIMIOFÁRMACOS.....	43
6.2 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS PREVENTIVOS DE LA RHEPO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR LOS QUIMIOFÁRMACOS.....	44
6.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RHEPO SOBRE LA MUERTE DE CÉLULAS TUMORALES MEDIADA POR CISPLATINO Y DOXORUBICINA EN UN MODELO MURINO.....	51
6.4 INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA CON LOVASTATINA	54
6.5 ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE JAK 2 EN LOS EFECTOS DE LA RHEPO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR ALGUNOS DE LOS QUIMIOFÁRMACOS.....	56
6.6 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA RHEPO SOBRE LA MUERTE MEDIANTE EL MÉTODO DEL TUNEL.....	58
6.7 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE CASPASA 3 ACTIVA.....	61
6.8 EFECTO DE LA RHEPO SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR.....	63
6.9 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA RHEPO PARA INDUCIR RESISTENCIA CELULAR A LOS QUIMIOFÁRMACOS.....	66
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>83</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>
<b>XI. APÉNDICE.....</b>	<b>110</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIF</b>	Factor inducible de apoptosis
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>APAF-1</b>	Apoptosis protease-activating factor-1
<b>APC</b>	Anaphase-promoting complex
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>CaCu</b>	Cáncer cervicouterino
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase
<b>CTR</b>	Copper transporter
<b>DL</b>	Dosis letal
<b>Epo</b>	Eritropoyetina
<b>EPO-R</b>	Receptor para eritropoyetina
<b>ER</b>	Oestrogen receptor
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>HIF</b>	Hypoxia-inducible factor
<b>HRE</b>	Hypoxia-responsive element
<b>IAP</b>	Inhibitors of apoptosis proteins
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>OCT</b>	Organic cation transporter
<b>PARP</b>	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>pVHL</b>	Proteína von-Hippel Lindau
<b>rhEpo</b>	Eritropoyetina recombinante humana
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>TdT</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>TUNEL</b>	TdT – mediated dUTP – biotin nick end labeling
<b>U</b>	Unidades
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa el 9.8% de todos los cánceres a nivel mundial (Parkin *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2005). Es el segundo cáncer más común entre las mujeres de los países en vías de desarrollo como México y es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Alonso *et al.*, 2005).

El cáncer cervicouterino se desarrolla a través de distintas etapas: La primera etapa es la infección por el virus del papiloma y el epitelio puede permanecer en ese estado para luego, en algunos casos, pasar a lo que se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que se considera una lesión premaligna en la que existe un crecimiento de células anormales en el tejido cervical. Las neoplasias intraepiteliales cervicales se clasifican en I, II y III según la etapa de invasión. Estas lesiones pueden a su vez desarrollarse hasta un cáncer *in situ*, es decir, aquel que aún está delimitado. Luego de esta etapa, se puede producir un cáncer invasor, que es aquel que ha roto la membrana basal del tejido donde se originó y que tiene el potencial para migrar a otros tejidos convirtiéndose en metástasis (Torroella *et al.*, 1998).

Los virus del papiloma humano (VPH) genitales de alto riesgo son los agentes de mayor riesgo para la carcinogénesis cervical. De hecho, estos virus se han encontrado asociados con el 99.7% de casos de cáncer cervicouterino a nivel mundial (Bosch *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). Los VPH de alto riesgo son aquellos que se asocian con las NIC II-III, el carcinoma *in situ* (CIS) y el CaCu. Los VPH de alto riesgo más comunes son los tipos 16 y 18. Se considera a estos tipos

de virus como “de alto riesgo” o VPH oncogénicos pues es poco probable que estas lesiones tengan una regresión espontánea a un epitelio sano.

En su comienzo, el cáncer cervicouterino produce pocos síntomas. A medida que la neoplasia progresa, los síntomas clínicos son diversos, pero el más común es la hemorragia.

Las lesiones precursoras del carcinoma cervical se detectan mediante el Papanicolau (Pap) (Papanicolau *et al.*, 1941) y pueden ser tratadas mediante crioterapia, escisión, cauterización o láser para evitar su progresión, mientras que para el cáncer cervicouterino los tratamientos más comunes son la intervención quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. Estos tratamientos pueden combinarse (Torroella *et al.*, 1998). Los diferentes tratamientos inducen distintos tipos de muerte celular que se mencionan más adelante.

## **1.2 MUERTE CELULAR**

Se han reconocido y descrito cuatro actividades celulares que inducen muerte celular: necrosis, apoptosis, catástrofe mitótica y autofagia. La interrupción permanente del ciclo celular, conocida como senescencia, se considera un tipo de muerte celular en el contexto del estudio del cáncer. Estos cinco procesos celulares se basan en distintas características bioquímicas y morfológicas que se presentan en la célula que está muriendo. La apoptosis y la autofagia se consideran “muerte celular programada”, lo que se refiere a que tienen un control genético, mientras que la necrosis y la catástrofe mitótica se consideran respuestas pasivas a daños celulares. La desregulación de las vías que controlan

cada uno de éstos tipos de muerte celular se asocia con eventos de tumorigénesis (Ricci *et al.*, 2006).

### **1.2.1 Necrosis**

Es un proceso de destrucción celular desordenado que se da luego de un trauma, un proceso de inflamación, infección o isquemia y concluye con la liberación de los componentes celulares. Se produce por la inhibición de la producción de la energía celular, la pérdida del balance del flujo de calcio intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de ciertas proteasas que también pueden inducir apoptosis (descrita a continuación) como las catepsinas (Broker *et al.*, 2005), y las calpaínas (Spencer *et al.*, 1995). La energía celular se termina, lo que provoca que las bombas y canales pierdan sus funciones. La membrana celular se distorsiona, los organelos se degradan y se hinchan al igual que la célula. Las vías de señalización de este proceso siguen siendo un misterio (Okada *et al.*, 2004).

### **1.2.2 Apoptosis**

Es la forma mejor conocida de muerte celular. Es esencial en el desarrollo embrionario, en las funciones del sistema inmune y en mantener la homeostasis de los tejidos (Prindull, 1995). La desregulación de este tipo de muerte celular está asociada con enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes o cáncer. Los cambios morfológicos propios de la apoptosis son la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y el corte del ADN en un cierto escalamiento con cortes ordenados cada 180 pares de bases (en inglés se le llama DNA

laddering). La célula se encoge y el citoplasma se fragmenta formándose cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son reconocidos por macrófagos que se encargan de eliminarlos.

La forma más estudiada de la apoptosis es la mediada por proteasas que contienen una cisteína en su sitio activo y que escinden proteínas en residuos específicos de ácido aspártico conocidas como caspasas (Thornberry *et al.*, 1998). Las caspasas se expresan inicialmente como zimógenos, llamados pro-caspasas, que son las precursoras de las caspasas activadas.

Las caspasas se clasifican en iniciadoras y efectoras. Las primeras forman agregados y el hecho de que estén en estrecho contacto, les permite activarse, presentando un cambio conformacional debido a que una escinde a otra. Las principales caspasas iniciadoras son la 2, 8, 9 y 10. Las caspasas efectoras necesitan ser activadas por alguna caspasa iniciadora igualmente mediante escisión de su pro-caspasa. Una vez activadas, éstas caspasas escinden proteínas clave para la célula, como las láminas nucleares, lo que resulta en todos los cambios bioquímicos y morfológicos propios de este tipo de muerte que se mencionan más adelante. Las caspasas efectoras más importantes son la 3, 6 y 7. Se conocen dos vías por las que esta cadena de caspasas se activa: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Danial *et al.*, 2004; Nagata 1997; Cory *et al.*, 2002).

La vía extrínseca (Figura 1) se da cuando se activan los receptores de muerte presentes en la superficie celular por unión de sus ligandos extracelulares. Estos ligandos son Fas-L que se une a su receptor Fas y el ligando factor de necrosis tumoral (TNF del inglés tumor necrosis factor) que se une a su receptor TNFR (del inglés tumor necrosis factor receptor) (Locksley *et al.*, 2001). La activación de

estos receptores hace que se forme el complejo inducido por señales de muerte (DISC, por death-induced signalling complex) que recluta a la caspasa 8 quien activa a la caspasa 3 (Nicholson *et al.*, 2003) y a la 7 (Cohen 1997).

La vía intrínseca (Figura 1) se desencadena por diversos estímulos intracelulares como la falta de nutrientes, una infección viral, niveles altos de ERO, la hipoxia, el daño al ADN y la activación de oncogenes. La respuesta a estos estímulos se da en la mitocondria, cuya membrana externa pierde el control de su permeabilización permitiendo la salida de citocromo *c* y de otras moléculas pro-apoptóticas. La salida del citocromo *c* permite la formación del apoptosoma, un complejo protéico que contiene citocromo *c*, factor activador de proteasas apoptóticas (APAF1 por apoptotic protease activating factor 1), pro-caspasa 9 y dATP (Deoxiadenosin-trifosfato) (Liu *et al.*, 1996). Esto activa a la caspasa 9 que se encarga de activar a las caspasas efectoras 3 y 7. La caspasa 3 a su vez, activa a la caspasa 6 (Nicholson *et al.*, 2003).

La salida de las proteínas apoptóticas de la mitocondria está regulada en algunas ocasiones por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Las proteínas Bcl-2 contienen de uno a cuatro dominios homólogos a Bcl-2 (BH). El número y la combinación de estos dominios determinan si la proteína es pro- o anti-apoptótica. Las proteínas anti-apoptóticas contienen cuatro dominios BH. Algunas de estas proteínas son: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1/A1. Las proteínas pro-apoptóticas carecen del cuarto dominio BH y se dividen en dos grupos: los miembros que solo tienen el dominio BH3, como Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf entre muchas otras, y los miembros multidominio BH1-3 como Bax y Bak. Bax se encuentra en el citosol y también unida débilmente a la membrana plasmática

(Suzuki *et al.*, 2000) y Bak en la membrana externa de la mitocondria junto con Mcl-1 o Bcl-xL. (Scorrano *et al.*, 2003, Willis *et al.*, 2005). Cuando Bax y/o Bak se oligomerizan, se fijan a la membrana externa mitocondrial y forman poros, lo que permite que se dé la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Las proteínas Bid y Bim activan directamente los monómeros de Bax y Bak para que puedan formar los oligómeros, mientras que proteínas como Bad, Noxa y Puma, facilitan esta oligomerización bloqueando a proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL, quienes son inhibidoras de la activación de Bax y Bak (Chipuk *et al.*, 2006).

Adicionalmente existen las llamadas proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs por inhibitor of apoptosis proteins). Estas proteínas pueden unirse e inhibir el sitio activo de las caspasas 3, 7 y 9 (LaCasse *et al.*, 1998). Para evitar que esto suceda, cuando se desencadenan los procesos mencionados anteriormente, son bloqueadas por otros complejos como DIABLO/SMAC u OMI/HTRA2 (Du *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Verhagen *et al.*, 2000), que también son liberados de la mitocondria luego de la permeabilización de la membrana externa.

La proteína Bid conecta la vía extrínseca con la mitocondrial o intrínseca. La caspasa 8 corta a Bid permitiendo que quede expuesto un residuo de glicina formando tBid. tBid viaja a la membrana mitocondrial donde promueve la oligomerización de Bax y Bak (Li *et al.*, 1998, Luo *et al.*, 1998).

Algunas condiciones de estrés como la radiación ionizante o algunas formas de quimioterapia, activan las respuestas al daño del ADN que incluyen la estabilización de p53 (proteína supresora de tumores), quien induce que el ciclo celular se detenga activando la transcripción de p21. Esto permite que la célula tenga tiempo de reparar el daño. Si esto no ocurre, la célula inicia un proceso de

apoptosis. p53 activa la transcripción de genes pro-apoptóticos como los que codifican para Bax, Bid, Noxa y Puma (El-Deiry 2003) y también se sabe que p53 puede inducir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial al unirse a miembros de la familia Bcl-2 y facilitar la oligomerización de Bax y Bak (Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003). Así mismo, p53 puede inducir la activación de la vía extrínseca de la apoptosis induciendo la expresión del receptor Fas (Haupt *et al.*, 2003). Pero p53 no solo es capaz de activar las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, si no que también puede activar directamente a las caspasas 6 (MacLachlan *et al.*, 2002) y 8 (Ding *et al.*, 1998). El mecanismo por el cual p53 activa a la caspasa 6 involucra, la unión de p53 al tercer intrón del gen de la caspasa 6 y su transactivación. Esto incrementa el nivel de pro-caspasa 6 y por lo tanto, de caspasa 6 activa. En cuanto a la caspasa 8, se ha encontrado que p53 se une a su promotor (Liedtke *et al.*, 2003).

Existen otras moléculas capaces de provocar muerte apoptótica pero sin activar caspasas. Este tipo de muerte celular es conocida como apoptosis independiente de caspasas. Algunas de estas moléculas son: la Endonucleasa G, una ADNasa mitocondrial que se libera luego de algún estímulo apoptótico y que es responsable de la condensación de la cromatina así como de la fragmentación del ADN (Van Loo *et al.*, 2002); el factor inductor de apoptosis (AIF por apoptosis inducing factor), liberado también de la mitocondria, que se transloca al núcleo e induce, mediante un mecanismo aún no definido, que la cromatina se condense (Daugas *et al.*, 2000); las catepsinas (siendo la B y la D las más estudiadas) que una vez que son liberadas de los lisosomas pueden inducir apoptosis independiente de caspasas por mecanismos no bien definidos todavía (Broker *et*



*al.*, 2004) pero que en ocasiones involucran la liberación de AIF de la mitocondria (Bidere *et al.*, 2003).

Se ha encontrado también, que las calpaínas (proteasas de cisteína que se activan con el aumento de la concentración de calcio intracelular) pueden provocar muerte apoptotica sin la activación aparente de caspasas (Polster *et al.*, 2005; Vandenabeele *et al.*, 2005).

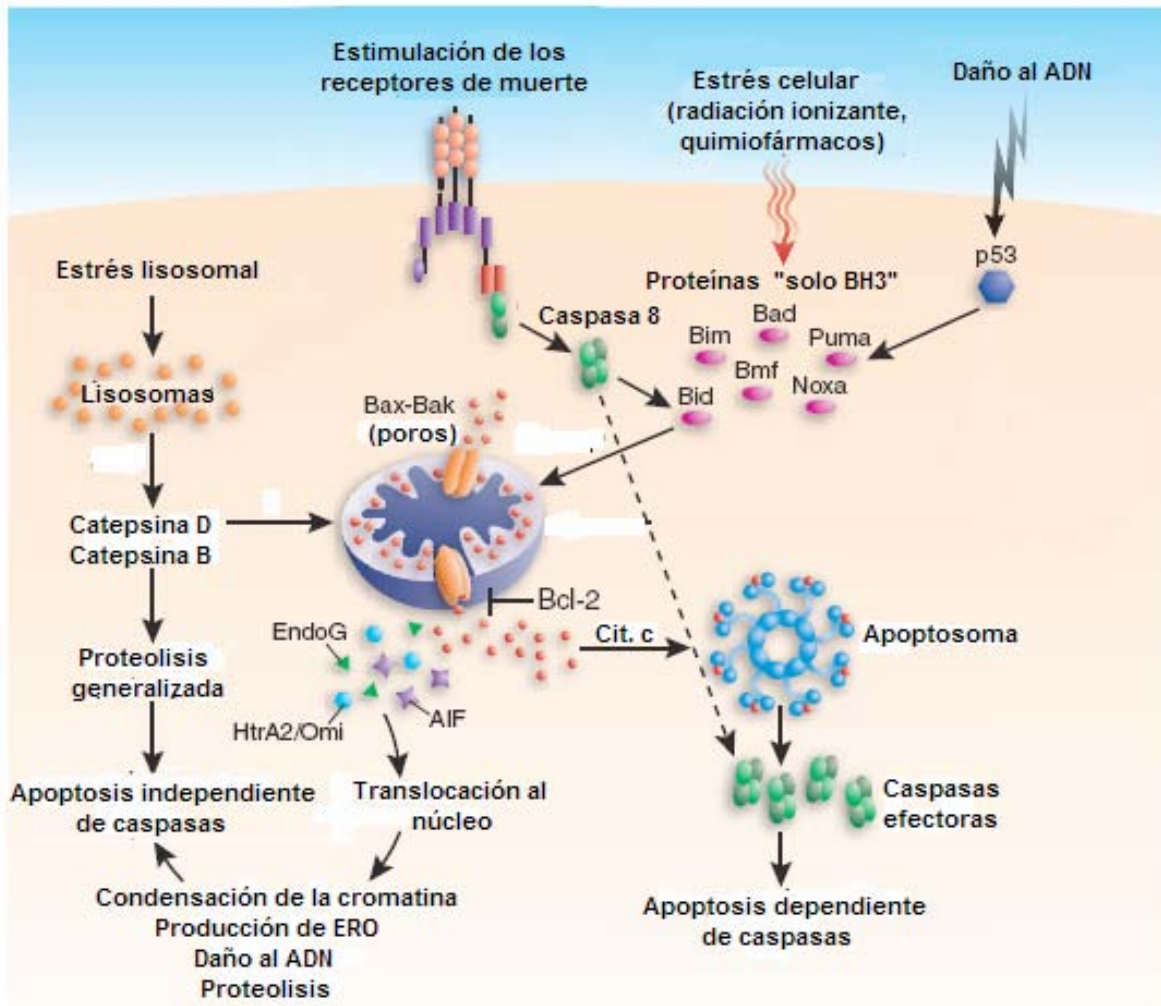


Fig. 1. Vía general de la apoptosis dependiente e independiente de caspasas (Modificado de Kroemer *et al.*, 2005).

### 1.2.3 Autofagia

A diferencia de la apoptosis y la necrosis, la autofagia no siempre es sinónimo de muerte celular. Es un proceso que la célula utiliza para degradar y reciclar proteínas y organelos (viejos y/o dañados principalmente) (Klionsky *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000), lo que puede ser necesario para el remodelamiento celular durante la diferenciación, en condiciones de estrés por falta de nutrientes (como factores de crecimiento o amino-ácidos) (Lum *et al.*, 2005; Shintani *et al.*, 2004) o cuando se presentan daños celulares por algún agente citotóxico (Levine *et al.*, 2004). Su desregulación se asocia con cardiomiopatías, miopatías (Kalimo *et al.*, 1988), enfermedades neurodegenerativas (Bahr *et al.*, 2002), infecciones (Klionsky 2003) y cáncer (Liang *et al.*, 1999). En condiciones de estrés la autofagia puede promover la supervivencia celular pero si es excesiva, la célula muere (Hait *et al.*, 2006). El fenómeno de la autofagia se ha observado en levaduras, plantas, nematodos, moscas, ratones y humanos. Originalmente fue descrita en mamíferos, pero hoy la mayoría de la información que se tiene es de estudios hechos en levaduras (Takeshige *et al.*, 1992).

La principal característica de las células que están bajo un proceso de autofagia, es que al microscopio presentan gran cantidad de vesículas con doble membrana (de origen desconocido pero que en mamíferos se cree se da en el retículo endoplásmico) llamados autofagosomas. Además, se puede detectar la presencia de la proteína LC3, la cual se encuentra asociada a los microtubulos pero que al formarse los autofagosomas, queda atrapada en ellos. Una vez que se ha inducido la autofagia, se sintetizan los autofagosomas que envuelven a los organelos completos o a las proteínas aisladas que se van a degradar. Estos autofagosomas

se fusionan con lisosomas formando lo que se conoce como autolisosomas. El contenido de los autolisosomas es degradado por la acción de las hidrolasas presentes dentro de éstos.

Se sabe que hay genes relacionados con la autofagia que en la levadura reciben el nombre de ATGs. Este conjunto de genes es responsable de regular la inducción de este proceso, la formación y expansión de los autofagosomas, de su fusión con los lisosomas y del reciclamiento del contenido de estas vesículas para que se puedan generar proteínas nuevas y se pueda sintetizar ATP (Kroemer *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2004).

Existen investigaciones que demuestran la existencia de los homólogos a los genes ATGs en los mamíferos. BECN1 es el homólogo al gen Atg6 de la levadura. La proteína se llama beclin1. Se ha visto que este gen es responsable de la formación de los autofagosomas (Liang *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1999) y se ha encontrado que falta monoalélicamente en carcinomas espontáneos de mama (Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007), ovario (Liang *et al.*, 1999) y próstata (Gao *et al.*, 1995).

A nivel molecular (Figura 2), la autofagia esta controlada principalmente por mTOR (el blanco de la rapamicina, una droga inmunosupresora utilizada para evitar el rechazo de órganos). mTOR integra las respuestas celulares a la falta de nutrientes y factores de crecimiento. mTOR es regulado por la via PI3K/Akt (Inoki K *et al.*, 2005). mTOR es un sensor de la cantidad de nutrientes, por lo que permite o inhibe que se de la autofagia. Cuando hay nutrientes, mTOR permite que se de la síntesis de proteínas y se inhibe la autofagia. Esto lo hace fosforilando a la cinasa S6 e incrementando la traducción de mRNAs que codifican

para proteínas ribosomales (Meyuhas 2000). Se activa el factor eIF4 que promueve la proliferación celular incrementando la activación de la ciclina D, c-Myc y el factor de crecimiento vascular endotelial (Mamane *et al.*, 2004). Además, en la presencia de nutrientes, mTOR junto con AMP y la cinasa S6 promueven la elongación de péptidos regulando la fosforilación del factor de elongación de eucariontes 2 (eEF-2). Si faltan nutrientes, mTOR es inactivado por la AMP cinasa, lo que impide la síntesis de proteínas pues la fosforilación de la cinasa S6 disminuye y la formación del factor eIF4 no se da (Inoki *et al.*, 2005). Esto para conservar la energía celular y evitar la necrosis. Este es un mecanismo que las células han desarrollado para mantener los niveles de ATP evitando la síntesis de proteínas y reciclando los aminoácidos producidos por la digestión de proteínas y organelos en los autolisosomas.

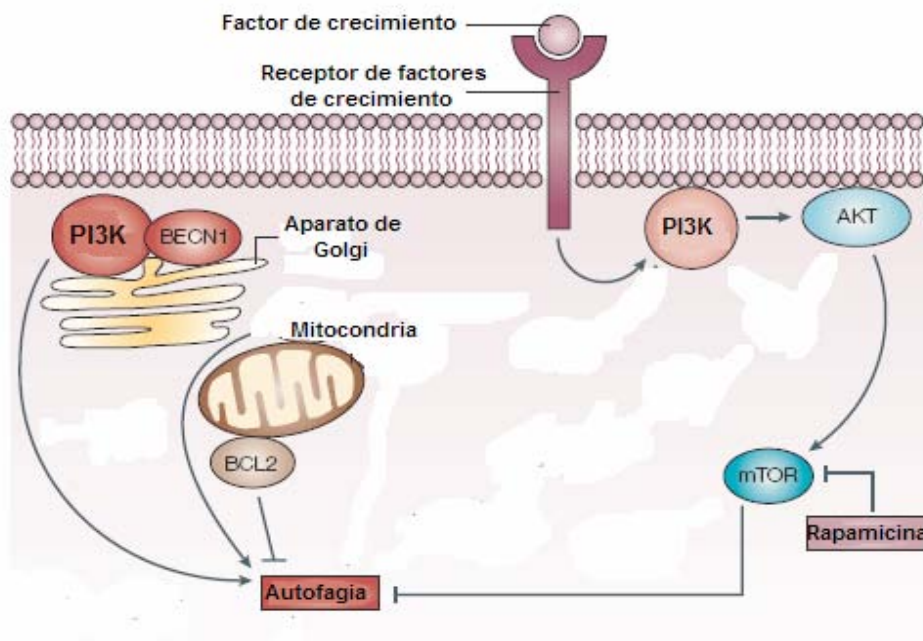


Fig. 2. Vía común de la autofagia (Modificado de Kondo *et al.*, 2005).

#### 1.2.4 Catástrofe mitótica

En la mayoría de las ocasiones se le considera más bien un inductor irreversible de muerte celular (Weaver *et al.*, 2005) (por apoptosis en la mayoría de los casos). Sin embargo, se ha observado que en ocasiones, cuando se produce una mitosis aberrante y se da una segregación inadecuada de los cromosomas, las células mueren rápidamente por la propia catástrofe mitótica (Castedo *et al.*, 2004), cuyo mecanismo aun es desconocido. Para entender mejor la catástrofe mitótica, se debe recordar primero el proceso de la mitosis:

En las células somáticas normales, la fase M del ciclo celular comprende dos etapas: la mitosis, en la que las cromátidas hermanas se alinean y luego se segregan en dos células hijas; y la citocinesis, en la que el citoplasma y su contenido se reparte entre esas dos células hijas. La entrada a la fase M, posterior a la fase G<sub>2</sub>, se da por la activación de CDK1 (en mamíferos Cdc2). Brevemente, antes de la mitosis, CDK1 se encuentra en un estado inactivo al estar fosforilada por las cinasas Wee1 y Myt1 en los residuos Tyr<sup>15</sup> y Thr<sup>14</sup> respectivamente (Nigg 1995). Al final de la fase G<sub>2</sub>, CDK1 se activa cuando la fosfatasa CDC25C (activada por la cinasa Plk 1), desfosforila estos residuos y CAK fosforila el residuo Thr<sup>161</sup>. La CDK1 activada se une a la ciclina B1 y forman un complejo promotor de la mitosis que se trasloca al núcleo y fosforila a un gran número de sustratos, lo que promueve la ruptura de la envoltura nuclear, la separación del centrosoma, el ensamble del huso mitótico y la condensación de los cromosomas (Kimura *et al.*, 1998; Gonczy 2002; Karsenti *et al.*, 2001), pasos necesarios para que la mitosis progrese desde la profase hasta la metafase y ocurran de una manera correcta. Al final de la metafase, este complejo debe ser destruido para que inicie la anafase

(ver más adelante). La ciclina B1 es destruida, con lo que CDK1 queda sola y vuelve a ser fosforilada e inactivada para que el ciclo progrese a la anafase.

El ensamble del huso mitótico es un proceso muy importante y es necesario para que la mitosis se lleve a cabo. La cinasa Aurora A es muy importante en dicho proceso, ya que participa en la formación del huso mitótico regulando la separación de los centriolos para que la formación del huso sea bipolar. Además, recluta  $\gamma$ -tubulina, proteína que forma los microtubulos que forman dicho huso mitótico.

Existe un punto de control (checkpoint) que se da en el momento del ensamble del huso mitótico y se le conoce con ese nombre, o bien, punto de control mitótico. Su función es la de evitar la separación de las cromátidas hermanas hasta que todos los cromosomas se hayan unido adecuadamente al huso (unión bipolar). Dicho de otra manera, previene el progreso de la metafase a la anafase si existe algún error. Este se encarga además de verificar que los cromosomas se segreguen correctamente para producir células hijas idénticas genéticamente.

Los cromosomas se unen al huso mediante sus cinetocoros. La cinasa Aurora B regula la correcta orientación de los cromosomas en el huso y la asociación de los cinetocoros de los cromosomas a los microtubulos del huso. Si algún cinetocoro no se une, se generan señales que retrasan el inicio de la anafase hasta que todos los cinetocoros se hayan unido. Estas señales se dan por la unión a los cinetocoros no unidos de las proteínas MAD1, MAD 2 Y MAD3 entre otras.

El paso a la anafase es controlado por el complejo APC (anaphase promoting complex). Este complejo es una ligasa de ubiquitina E3 que marca ciertos

sustratos mitóticos (incluida la ciclina B del complejo promotor de la mitosis) como las securinas, que mantienen unidas las cromátidas hermanas que deben ser degradados por proteosomas para que inicie la anafase. Si se inhibe este complejo por señales como las de un cinetocoro no unido, se detiene el ciclo celular antes de entrar a esta etapa de la mitosis para que el daño sea reparado.

Cualquier defecto o inactivación de los elementos antes mencionados, provoca que el ciclo celular no se detenga y que éste continúe pero con defectos, lo que ocasiona muerte celular por catástrofe mitótica, ya que como consecuencia se tienen cromosomas mal segregados o células aneuploides, que inducen una rápida muerte celular o inducen que se activen las vías mitocondriales mencionadas anteriormente en las que se activan las caspasas 3 y 9. Morfológicamente la catástrofe mitótica se asocia con células gigantes ya sea con múltiples micronúcleos o dos núcleos (Okada *et al.*, 2004).

En las células cancerosas es muy común que estos puntos de control no funcionen adecuadamente y se produzca esto. Además, existen fármacos que bloquean algunos de estos puntos de control para inducir la catástrofe mitótica en las células.

Por otro lado, si estos mecanismos funcionan adecuadamente pero el daño a los microtubulos es irreversible y/o el arresto del ciclo es insuficiente para repararlo, la célula inicia un proceso de apoptosis. Así mismo, se puede dar un arresto crónico (la célula deja de replicarse, queda senescente). Es debido a que el destino de la célula puede culminar en apoptosis o en senescencia (descrito a continuación), el porque de que muchos autores consideren a la catástrofe mitótica como un

mecanismo inductor de apoptosis o senescencia en vez de un tipo de muerte celular *per se* (Castedo M *et al.*, 2004).

Los agentes que dañan los microtubulos, como el paclitaxel o los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina) inducen este tipo de muerte celular (Jordan *et al.*, 1996).

### **1.2.5 Senescencia**

La senescencia es un estado en el que las células interrumpen de manera permanente su replicación (Hayflick *et al.*, 1961). Las células se mantienen en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y ya no se dividen a pesar de ser viables y metabólicamente activas por largos períodos de tiempo. Se considera que tiene un importante papel suprimiendo la formación de tumores (Campisi 2001).

Anteriormente se consideraba que era controlada genéticamente a través de un mecanismo de conteo de los ciclos celulares que presenta la célula en el que los telómeros (secuencias repetitivas de ADN que protegen los extremos de los cromosomas) se van acortando. Hoy se acepta que, además de este control, puede ser inducida por una variedad de estímulos extrínsecos (como daños al ADN, activación de oncogenes, estrés oxidativo) (Schmitt *et al.*, 2002; TePoele *et al.*, 2002).

Cuando los telómeros alcanzan una determinada longitud, se activa la proteína p53 (Figura 3), quien a su vez activa a p21, lo que marca el inicio de la senescencia celular deteniendo el ciclo celular de la célula (Smogorzewska *et al.*, 2002). Las condiciones de estrés mencionadas anteriormente activan también a p53.



Otro elemento muy importante en la regulación de la senescencia es la proteína Rb, quien bloquea a las células en la fase G<sub>1</sub>. La proteína Rb es inhibida por las cinasas CDK2, CDK4 y CDK6 cuando éstas la fosforilan. La proteína p21 y la proteína p16<sup>INK4A</sup> inhiben justamente a estas cinasas para que Rb pueda llevar acabo su función (Sage *et al.*, 2003, Stein *et al.*, 1999).

Cuando las células están senescentes, su citoplasma se encoge, se vuelve granuloso intenso y muy vacuolado, pero el cambio característico de las células senescentes se da a nivel bioquímico, en donde se dan cambios en el metabolismo y la expresión de la enzima β-galactosidasa (enzima que cataliza la hidrólisis de β-galactósidos como la lactosa) aumenta, y a diferencia de lo que ocurre en una célula replicativamente activa, en las que la β-galactosidasa se encuentra en los lisosomas únicamente, en las células senescentes, esta enzima se expresa constitutivamente. Ocurre también la acumulación de heterocromatina (ADN transcripcionalmente silenciado).

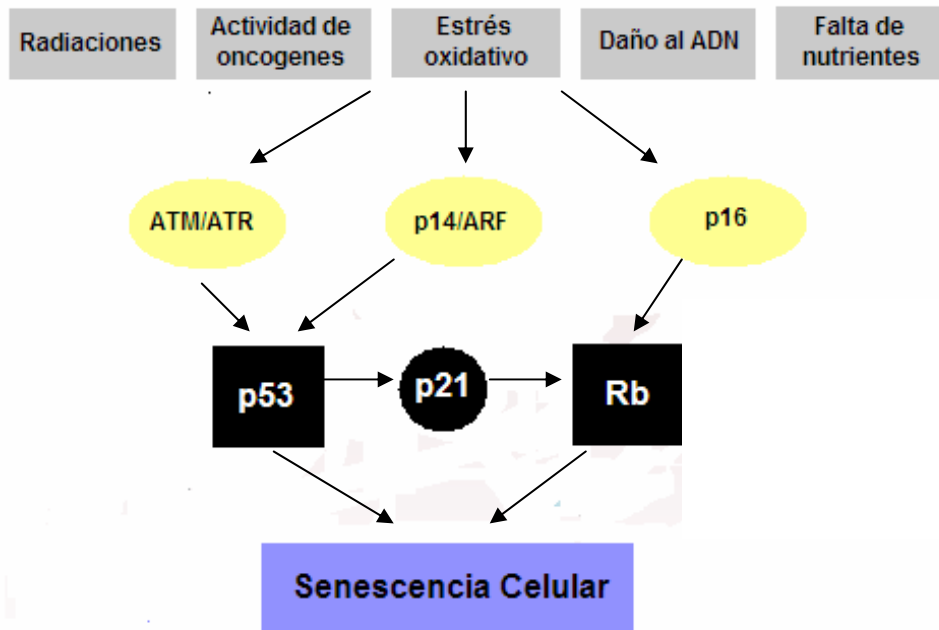


Fig. 3. Esquema de los elementos implicados en la senescencia (Modificado de Tsirpanilis 2007).

### 1.3 QUIMIOFÁRMACOS

La quimioterapia es el uso de drogas u hormonas para tratar el cáncer. Los quimiofármacos son drogas citotóxicas que actúan en el organismo de forma sistémica. La mayoría de los quimiofármacos actúan sobre las células mitóticamente activas (National Cancer Institute, EEUU, 2008, American Cancer Society, 2008) y su principal función es la de detener la multiplicación y expansión del tumor, dañando por ejemplo, el ADN de las células. Además, algunas drogas actúan únicamente sobre células que se encuentran en una fase específica del ciclo celular, como la fase S (síntesis del ADN) o la fase M (mitosis). En la actualidad existen además, medicamentos que han sido diseñados para actuar

sobre moléculas en específico, como pueden ser cinasas cuya sobreexpresión se asocia con la aparición de tumores.

Los quimiofármacos poseen efectos secundarios debido principalmente a que en el organismo no solo las células tumorales son mitóticamente activas. Las células progenitoras de los glóbulos blancos y rojos presentes en la médula ósea son gravemente afectadas por el uso de quimiofármacos. Esto provoca la disminución en la cantidad de glóbulos blancos, lo que trae como consecuencia la incidencia de infecciones, y la disminución de glóbulos rojos, lo que produce anemia (Groopman *et al.*, 1999).

Existen varias formas de clasificar a los agentes quimioterapéuticos: según su mecanismo de acción, de acuerdo a su estructura química, en base a su relación con otras drogas o según el tipo de muerte celular que provocan (American Cancer Society, 2008).

### **1.3.1 Cisplatino**

Dentro de los fármacos a base de platino, el cisplatino (cis-diamminedicloroplatino) es utilizado como quimioterapia base en la mayoría de los tumores sólidos, incluidos tumores de ovario, cabeza y cuello, pulmón y cervix (Jamieson *et al.*, 1999).

Brevemente, se ha encontrado que el cisplatino entra a la célula ayudado por el transportador de cationes orgánicos tipo 2 (OCT2 por sus siglas en ingles) (Choi *et al.*, 2008) o también, gracias al transportador de cobre tipo 1 (CTR1 por sus siglas en ingles) (Sinani *et al.*, 2007). Una vez dentro de la célula, los iones cloro de la molécula se pierden. El blanco principal es el ADN, donde el ion platino del

compuesto forma enlaces covalentes con las bases purinas. Luego de esto, en las posiciones en las que se encontraban los iones cloro, se forman los entrecruzamientos con las hebras del ADN. A estas interacciones se les conoce como aductos (uniones covalentes irreversibles que modifican químicamente la molécula en la que se forman) platino-ADN (Wang *et al.*, 2005). Estas modificaciones al ADN desencadenan diversos procesos mediados por proteínas y factores de transcripción, de los cuales, algunos están involucrados en la resistencia al fármaco. Algunos de los procesos que ocurren son: la activación de la vía Akt (Pommier *et al.*, 2004), la inducción de c-ABL (Shaul 2000), la interrupción del ciclo celular en G<sub>1</sub>/S o G<sub>2</sub>/M, y la inducción de vías de reparación del ADN mediadas por NER (del inglés nucleotide excision repair) (Furuta 2002) y MMR (del inglés mismatch repair proteins) (Bellacosa 2001).

A bajas concentraciones (< a 8µM), el cisplatino induce muerte por apoptosis, en dosis mayores se ha observado necrosis (Gonzalez *et al.*, 2001). Algunos de los elementos que se han observado y que corresponden a este tipo de muerte celular son: caspasa 3 activada, liberación de citocromo c, caspasa 8 activada, APAF-1, caspasa 9 activada y aumento de FasL (Cummings *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005).

### **1.3.2 Paclitaxel**

El paclitaxel, comúnmente conocido como taxol, comenzó a utilizarse como antineoplásico desde 1971. Se utiliza en tumores recurrentes en la mayoría de los casos en combinación con otros quimiofármacos base (como el cisplatino o la

doxorubicina) y también en casos de metástasis. Se extrae de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* (De Bree *et al.*, 2006). Es una de las llamadas “drogas de los microtúbulos”, pues afecta directamente la dinámica de estos componentes celulares al volverlos rígidos o estables (De Bree *et al.*, 2006). Al ocurrir esto, el huso mitótico se forma de manera anormal (multipolar) (Weaver *et al.*, 2005), lo que da inicio al proceso conocido como catástrofe mitótica. Sin embargo, se ha observado que si el arresto mitótico es largo, se presenta muerte por apoptosis, con activación de caspasas (3, 8, 9), activación de Bax y liberación de PARP. En algunos tipos celulares, se observa que es necesario que aumenten los niveles de FasL para que se de la activación de caspasas luego del tratamiento con paclitaxel (Blagosklonny *et al.*, 2002). Por otro lado, esta droga induce la fosforilación de Bcl-2, lo que impide sus efectos anti-apoptóticos (Blagosklonny *et al.*, 1999).

### **1.3.3 Doxorubicina**

La doxorubicina es conocida también como adriblastina o adriamicina. Se obtiene a partir de bacterias del género *Streptomyces*. Su uso en el tratamiento contra el cáncer comenzó desde 1960 como quimioterapia de primera línea en todo tipo de tumores (Stewart *et al.*, 1997). Su estructura le confiere muchos efectos secundarios negativos, por lo que en ciertos tumores como los de ovario, cérvix y endometrio, su uso actualmente es limitado. No se sabe con exactitud si este fármaco entra a la células por difusión (Dalmark *et al.*, 1981) o si lo hace mediante algún sistema de transporte activo (Decorti *et al.*, 1989). Una vez dentro de las células, la doxorubicina desencadena 3 procesos: daño al ADN por intercalación entre las pares de bases (Meriweather *et al.*, 1972), generación de radicales libres

e inhibición o alteración de importantes enzimas como la topoisomerasa I, II, ADN polimerasas, ARN polimerasas y enzimas de reparación de ADN (Hortobagui 1997). De lo anterior, la intercalación en el ADN y la inhibición de la topoisomerasa II son los principales procesos que le confieren su actividad antitumoral induciendo primero, que el ciclo celular se detenga y después, muerte por apoptosis (dependiente o independiente de caspasas). Luego de tratar células con doxorubicina, se observa la acumulación de p53 en el núcleo celular, seguida de activación de caspasa 3 y 9 junto con acumulación de PARP o bien, únicamente p53 y PARP sin la activación de caspasas (Bruynzeel *et al.*, 2007). Por otro lado, la Doxorubicina puede activar al factor nuclear kappa B (NFκB) seguido de un aumento de catepsina B (Bien *et al.*, 2004).

#### **1.3.4 Tamoxifén**

El tamoxifén es una droga que se ha utilizado desde hace 20 años en el tratamiento del cáncer de mama tanto en mujeres como en hombres y cuyo uso en otro tipo de tumores como los glioblastomas está bajo investigación (Robins *et al.*, 2006). Su mecanismo de acción se basa en que compite con los estrógenos por la unión al receptor de éstos. Cuando el tamoxifén se une a los receptores de estrógenos (ER, por sus siglas en inglés), los estrógenos ya no pueden unirse y por lo tanto, se inhiben los procesos desencadenados por los estrógenos en las células entre los que se encuentran la vía PI3K/AKT y la vía MAPK (Ring *et al.*, 2004). Se considera que el tamoxifén induce autofagia en las células tratadas debido a que los estrógenos pueden ser para muchas células (incluidas las células

tumorales de mama) nutrientes esenciales y porque la inhibición de la vía PI3K/AKT induce autofagia (Inoki *et al.*, 2005). También puede inducir apoptosis, la cuál es independiente de la presencia del receptor para estrógenos y cuya inducción es mediada por la generación de especies reactivas al oxígeno (Lee *et al.*, 2000).

La tabla siguiente muestra los diferentes tipos de muerte celular que pueden inducir los quimiofármacos que se mencionaron anteriormente.

**Tabla 1. Tipos de muerte inducidos por los quimiofármacos.**

QUIMIOFÁRMACO	TIPO DE MUERTE INDUCIDA			
	Necrosis	Apoptosis	Catastrofe mitótica	Autofagia
Cisplatino	★	★		
Paclitaxel		★	★	
Doxorubicina		★		
Tamoxifén		★		★

#### 1.4 ANEMIA

La anemia es una condición en la que los niveles de hemoglobina son menores a los 12 g/dl de sangre (Groopman *et al.*, 1999). En los pacientes con cáncer, la anemia se presenta con frecuencia y su origen es multifactorial (Moliterno *et al.*, 1996): factores asociados con el propio tumor, como los sangrados que provoca al

crecer y romper los tejidos aledaños; la deficiencia en ácido fólico y vitamina B12, así como la hemólisis que resulta de la respuesta inmune en la que se forman anticuerpos contra las células rojas y las destruyen. Además, el tumor induce otras respuestas inmunitarias como la liberación de citocinas (Faquin *et al.*, 1992) (principalmente interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) que bloquean la producción de eritropoyetina endógena en el riñón (activando el factor de transcripción GATA-2 y el factor nuclear  $\kappa$ -B) y por lo tanto inhiben la diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea (Faquin *et al.*, 1992). Estas citocinas además inducen directamente la muerte de los progenitores eritroides regulando positivamente la presencia de receptores para Fas (IFN- $\gamma$ ) y receptores TRAIL (TNF- $\alpha$ ) en éstos. El tumor además activa macrófagos que disminuyen la vida media de los eritrocitos en la sangre al fagocitarlos al igual que a las células de la médula y por lo tanto, se da un decremento en la utilización del hierro (Bohlis *et al.*, 2006). Estos macrófagos inducen también la apoptosis de los progenitores eritroides en la médula ósea al presentar el ligando Fas que se une a su receptor presente en los progenitores. También se observa que en pacientes con cáncer, existe un aumento en el número de granulocitos que expresan el ligando TRAIL en la médula ósea, que como en el caso anterior, inducen la apoptosis de los progenitores eritroides (Spivak, 2005).

Los tratamientos como la radioterapia y la quimioterapia inducen anemia al ser mielotóxicos (dañan progenitores eritroides) y/o nefrotóxicos (afectan células tubulares renales productoras de eritropoyetina) (Groopman *et al.*, 1999).



Aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer llegan anémicos al momento del diagnóstico y 40% más, desarrollan anemia al iniciar su tratamiento (Knight, 2004).

Los síntomas de la anemia incluyen dolor de cabeza, palpitaciones, taquicardia, dificultad para respirar, fatiga y dependiendo del grado de la anemia, daño severo en ciertos órganos como los riñones, los pulmones, el sistema inmune, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso. Además, la anemia se relaciona con un peor pronóstico y con una pobre respuesta al tratamiento antitumoral (Glaser, 2001). Por todo lo anterior, es importante corregir la anemia. Hace algunos años, el único tratamiento disponible era la transfusión sanguínea, el cual implicaba varios problemas como el tiempo que el paciente tenía que pasar en el hospital, la disponibilidad de sangre, daño pulmonar, sobretransfusión, modulación inmune capaz de provocar efectos adversos en el crecimiento del tumor y en los últimos años, el riesgo de infectarse con virus como el VIH, hepatitis B y C (Goodnough, 2005). Sin embargo, desde 1985, se logró producir la eritropoyetina humana (eritropoyetina recombinante humana) (Lin *et al.*, 1985), la cual, desde 1993 se convirtió en el tratamiento por excelencia de la anemia en pacientes con cáncer.

## **1.5 ERITROPOYETINA**

La eritropoyetina (Epo) es una glicoproteína de 30.4 kDa cuya porción peptídica le ayuda a unirse a su receptor (EpoR) mientras que la porción de carbohidratos le confiere protección cuando la molécula está en circulación (Dordal *et al.*, 1985). Su función es la inducción de la proliferación y diferenciación de los progenitores

eritroides en la médula ósea, además de protegerlos de la muerte celular programada (Spivak *et al.*, 1991). Durante la etapa fetal se produce principalmente en el hígado y a partir del nacimiento, su principal sitio de producción es el riñón (Maxwell PH *et al.*, 1997). Otros órganos que hoy se sabe producen ciertas cantidades de Epo son: hígado, cerebro, tracto genital femenino, testículos, placenta, bazo, pulmón y los folículos pilosos. En el cerebro, su función es protectora (ante condiciones de hipoxia-isquemia) (Kim *et al.*, 2008), al igual que en los folículos pilosos, a los que protege de la muerte por agentes quimioterapéuticos (Bodo *et al.*, 2007), mientras que en el tracto genital femenino induce angiogénesis (Yasuda *et al.*, 1998). En los otros órganos su función se desconoce, pero es probable que la Epo tenga funciones pleiotrópicas.

La hipoxia es el principal estímulo para su producción (Jelkmann, 1992). Sin embargo, otras condiciones pueden inducir también la producción de Epo, como por ejemplo: la hipoglucemia, la disminución de la cantidad de hemoglobina en la sangre, la disminución de la presión arterial, la disminución de la afinidad del oxígeno en la sangre, el aumento del calcio intracelular, la liberación de insulina, y las altas temperaturas (Jelkmann, 2004). En el útero, su producción es directamente proporcional a la concentración de estrógenos (Yasuda *et al.*, 1998). Brevemente, la regulación del gen de la Epo se da así: el elemento clave es el factor de transcripción llamado factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) que posee dos subunidades, la  $\alpha$ , que existe en el citoplasma, y la  $\beta$ , presente en el núcleo. En condiciones de normoxia, el oxígeno hace que la proteína von-Hippel-Lindau (pVHL) marque la subunidad  $\alpha$  para que esta sea ubiquitinizada y posteriormente

degradada. Cuando los niveles de oxígeno son bajos, esta degradación no ocurre y la subunidad  $\alpha$  puede translocarse al núcleo y unirse a la subunidad  $\beta$  con lo que el factor de transcripción queda ensamblado (Bruick *et al.*, 2002). En la región vecina al gen de la eritropoyetina existe una secuencia conocida como “elemento de respuesta a hipoxia” (HRE por sus siglas en inglés), es ahí donde HIF-1 se une y hace que aumente la expresión del gen de la Epo (Jelkmann 2004).

Para que la Epo lleve a cabo sus funciones, debe unirse a su receptor (EpoR). Este receptor, es un homodímero de la familia de los receptores de citocinas clase I. Hoy se sabe que el EpoR no solo se expresa en los progenitores eritroides, sino también en células endoteliales vasculares, músculo liso, mioblastos esqueléticos, miocitos cardíacos, neuronas, fotorreceptores de retina, estroma hepático, placenta, riñón, macrófagos y folículos pilosos (Hardee *et al.*, 2006).

Cuando la molécula de Epo se une al receptor, cada una de las moléculas que lo conforman presentan un cambio conformacional lo que hace que las moléculas del receptor se unan más entre sí (Remy *et al.*, 1999). Como resultado de esto, las moléculas de JAK2 que se encuentran asociadas a la región citoplásmica del EpoR, quedan lo suficientemente cerca para provocar su transfosforilación (Witthuhn *et al.*, 1993). La fosforilación de las moléculas de JAK2 les permite fosforilar a su vez los residuos de tirosina presentes en la región citoplásmica del receptor. A estos residuos fosforilados se pueden unir distintas moléculas que desencadenan distintas vías de señalización. Algunas de las vías que se sabe se desencadenan a partir de la unión de la Epo a su receptor son: la vía JAK/STAT, la vía PI3K/Akt, la vía de las MAP cinasas y la vía de la proteína-cinasa C

(Yoshimura *et al.*, 1998), las dos primeras involucradas en la supervivencia celular (Figura 4).

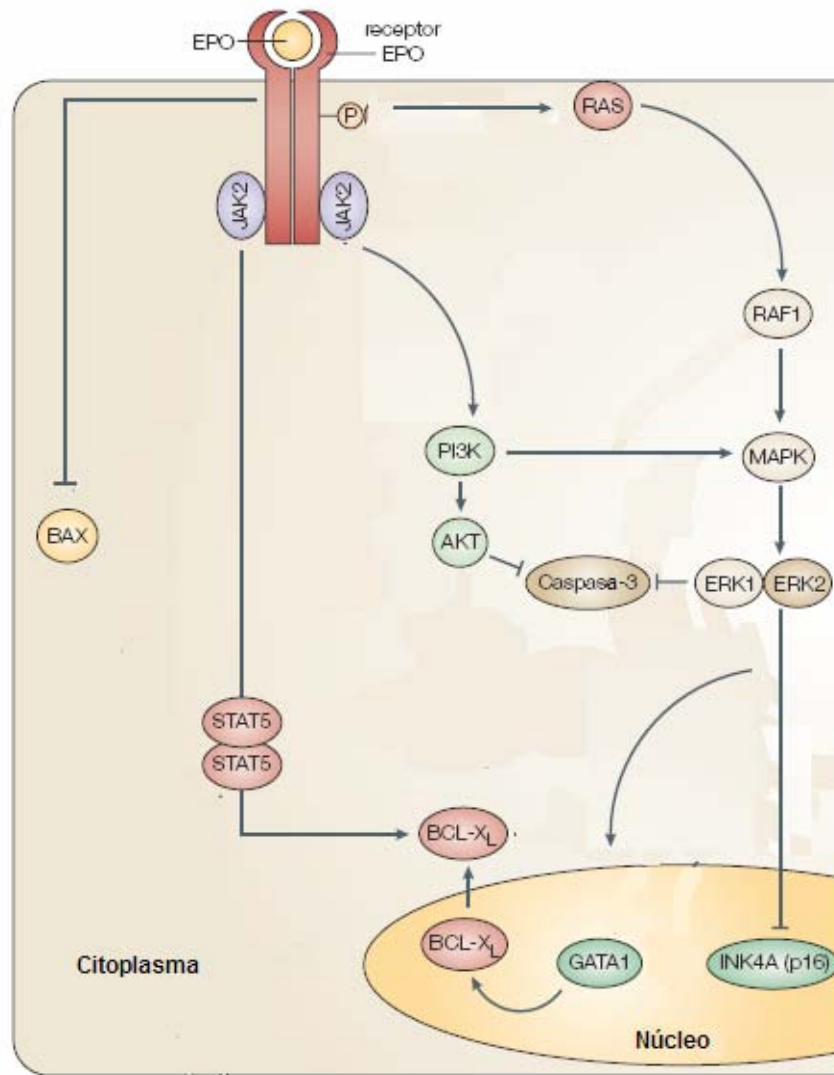


Fig. 4. Principales vías activadas por la unión de la eritropoyetina a su receptor. Se muestran las vías: JAK/STAT, MAPK y PI3K/AKT (Modificado de Spivak 2005).

### 1.5.1 Eritropoyetina recombinante humana

Gracias a los trabajos de Miyake y sus colaboradores, quienes colectaron 2550 litros de orina que contenía Epo para luego purificar la hormona (Miyake *et al.*, 1977) e identificar parcialmente su secuencia de aminoácidos, se logró

caracterizar el gen de la Epo humana y expresar éste en células CHO, que son células de ovario de hamster chino (Lin *et al.*, 1985). El resultado es epoetina alfa o beta (varían en los carbohidratos) que son comercializadas como eritropoyetina recombinante humana (rhEpo). La dosis de administración varía ampliamente según el tipo de tumor, el tipo de tratamiento y la gravedad de la anemia pero lo que se sugiere en la hoja técnica del medicamento es de 50 a 200 U/Kg de peso del paciente tres veces por semana para corregir la anemia y de 50 a 200 U/Kg de una a dos veces por semana para mantener los niveles adecuados durante el tratamiento antitumoral. Ésta se administra por vía intravenosa o subcutánea (Janssen-Cilag).

### **1.5.2 Eritropoyetina y su receptor en biopsias de tumores**

Mediante diversas técnicas (Western Blot, inmunohistoquímica, RT-PCR) se ha comprobado la presencia del receptor para eritropoyetina (que se creía específico de las células progenitoras eritroides) en biopsias de diversos carcinomas humanos como: mama (Arcasoy *et al.*, 2002), cervix (Yasuda *et al.*, 2002), endometrio (Acs *et al.*, 2004), ovario (Yasuda *et al.*, 2002), estómago (Yasuda *et al.*, 2003), colon (Arcasoy *et al.*, 2003), esófago (Yasuda *et al.*, 2003), cabeza y cuello (Arcasoy *et al.*, 2005), riñón (Westenfelder *et al.*, 2000), hígado (Batra *et al.*, 2003), pulmón (Arcasoy *et al.*, 2003), próstata (Yasuda *et al.*, 2003), piel (Kumar *et al.*, 2005), tiroides (Eccles *et al.*, 2003) y tumores del sistema nervioso (Batra *et al.*, 2003, Yasuda *et al.*, 2003) así como leucemias (Yasuda *et al.*, 2003). En varios casos, la eritropoyetina resultó modular el crecimiento de los tumores, estimulando su proliferación (Acs *et al.*, 2001; Westenfelder *et al.*, 2000; Westphal

*et al.*, 2002). Además, la relación Epo-EpoR, podría estar involucrada en otros eventos biológicos tumorales como la apoptosis y la sensibilidad a la terapia (radio y/o quimioterapia) (Kumar *et al.*, 2005; Belenkov *et al.*, 2004).

### **1.5.2.a Eritropoyetina y su receptor en tumores del tracto genital femenino**

Existen reportes de que la Epo induce vías de señalización que contribuyen al crecimiento y angiogenesis de tumores del tracto genital femenino (Yasuda *et al.*, 2001). Además, aproximadamente el 80% de los tumores cervicales producen Epo, y un 92% expresan el EPO-R. Lo anterior no se encontró relacionado con el nivel de oxígeno presente en los tumores. Las pacientes cuyo tumor presentó alta expresión de Epo, tuvieron menor tiempo libre de enfermedad, una efectividad más baja del tratamiento con radioterapia y menor tiempo de supervivencia (aproximadamente 30% menos). Las pacientes cuyo tumor presentó alta expresión del EPO-R no presentaron un comportamiento diferente al de las pacientes cuyo tumor tuvo baja expresión del EPO-R. La expresión de Epo y EPO-R no afectó la tasa de proliferación de los tumores, pero si disminuyó significativamente la tasa de apoptosis con respecto a los tumores negativos para Epo y EPO-R (Leo *et al.*, 2006).

En las líneas celulares HeLa (positiva para virus del papiloma tipo 18) y SiHa (positiva para virus del papiloma tipo 16) Acs *et al.*, (2003) encontraron que la expresión del EPO-R sí está correlacionada con los niveles de oxígeno, y que en condiciones de hipoxia, la expresión del EPO-R aumenta. En este mismo estudio

se encontró que la administración de rhEpo disminuía la muerte inducida por cisplatino en dichas líneas celulares.

También en HeLa, se ha observado que la administración de rhEpo activa el factor nuclear kappa B (Pajonk *et al.*, 2004).

## II. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, 90% de los pacientes con cáncer padecen anemia. Este padecimiento se asocia a una respuesta pobre tanto a la quimio como a la radioterapia, además de disminuir la calidad de vida de los pacientes generándoles entre otras cosas, fatiga. Por lo anterior, es importante corregir la anemia y hoy en día, el tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) se ha convertido en la principal alternativa a las transfusiones sanguíneas en nuestro país (López *et al.*, 2008; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2008). Sin embargo, existen reportes de casos en los que la rhEpo tiene influencia sobre la sensibilidad a la quimioterapia *in vivo* e *in vitro* (Batra *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2005). De los estudios realizados en pacientes con cáncer, algunos muestran un efecto negativo del uso de eritropoyetina observándose que el período libre de la enfermedad, el tiempo de supervivencia y la respuesta al tratamiento disminuyen en un 50% en comparación con los pacientes que no recibieron el tratamiento con la rhEpo (Temkin *et al.*, 2006; Leyland-Jones *et al.*, 2005; Ferrandina *et al.*, 2006; Henke *et al.*, 2006; Lavey *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, surgió la inquietud de evaluar si la rhEpo era capaz de ejercer algún efecto sobre la muerte inducida por agentes quimioterapéuticos en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical.



### **III. HIPÓTESIS**

Dado que la eritropoyetina desencadena vías de protección contra la apoptosis cuando se une a su receptor en los progenitores eritroides y sabiendo que dicho receptor se expresa en células derivadas de carcinoma cervical, se propone que la rhEpo ejercerá efectos protectores sobre la muerte inducida por algunos fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer cervicouterino.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la eritropoyetina rhEpo sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Calcular la dosis letal media de los fármacos cisplatino, paclitaxel, doxorubicina y tamoxifén para las líneas celulares derivadas de cáncer cervical HeLa, SiHa y C33.

2.- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de eritropoyetina sobre la muerte celular inducida por los quimiofármacos *in vitro*.

3.- Determinar la participación del receptor para eritropoyetina en el efecto de la eritropoyetina sobre la muerte celular inducida por los quimiofármacos.

4.- Analizar la participación de JAK 2 en los efectos de la eritropoyetina sobre la muerte inducida por los quimiofármacos.

5.- Estudiar el efecto de la administración de eritropoyetina sobre la muerte de células tumorales mediada por cisplatino y doxorubicina en un modelo murino, lo que se acepta es útil para extrapolar lo que podría ocurrir en humanos.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 LÍNEAS CELULARES Y QUIMIOFÁRMACOS**

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical humano HeLa, SiHa y C33. La línea celular HeLa posee ADN del virus del papiloma humano tipo 18 (VPH 18), la línea celular SiHa posee VPH tipo 16 y la línea celular C33 es negativa para VPH. Todos los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) GIBCO con 2% de suero fetal bovino GIBCO inactivado (apéndice), 0.5% de antibiótico penicilina-estreptomicina (10,000 U penicilina, 10,000 µg estreptomicina, Invitrogen), y en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C de temperatura. El suero fetal bovino fue inactivado para eliminar la eritropoyetina presente en éste.

Las células se resembraron cada tercer día utilizando verseno (apéndice) para desprender las células de la caja. El uso del verseno permite preservar los receptores membranales.

Los quimiofármacos utilizados fueron cisplatino (Blastolem RU®, Lemery), doxorubicina (Adriblastina RD®, Pfizer), paclitaxel (BrisTaxol®, Bristol-Myers) y tamoxifén (Sigma-Aldrich).

### **5.2 DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS LETALES DE LOS QUIMIOFÁRMACOS**

Para determinar la dosis letal media (DL 50) de los quimiofármacos, se sembraron 50,000 células/pozo en placas de 96 pozos. Después de 2 horas de incubación, se añadieron concentraciones crecientes de cada uno de los fármacos en un rango

desde 0.5  $\mu\text{g/ml}$  hasta 500  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizó una prueba de MTT a las 24 horas para obtener el porcentaje de viabilidad celular que había luego del tratamiento con cada dosis. Los datos se sometieron a una regresión lineal en el programa Excel (Microsoft) y con base en la ecuación obtenida se calculó la DL 50 para cada una de las líneas celulares y con cada uno de los fármacos.

### **5.3 PRUEBA DE MTT**

Transcurrido el tiempo del tratamiento que se deseaba evaluar, se retiró el medio y las células fueron lavadas dos veces con PBS (apéndice). Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo fresco (DMEM, GIBCO con 2% de SFB GIBCO) y 50  $\mu\text{l}$  de solución de MTT 2.4 mM (apéndice). La reacción se incubó por dos horas a 37 °C (5 % de  $\text{CO}_2$ ). Transcurridas las dos horas, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de isopropanol en los que se disolvieron los cristales formados resuspendiendo varias veces. Una vez disueltos los cristales, la placa se analizó en un lector de placas BioTek ELx800 a una longitud de onda de 570 nm. Los datos obtenidos fueron reportados como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control sin tratamiento.

### **5.4 ENSAYOS DE PROTECCIÓN CON ERITROPOYETINA.**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 50,000/200 $\mu\text{l}$ . Después de 2 horas de incubación se estimularon con diferentes concentraciones de rhEpo (Eprex®, Janssen-Cilag) (0 – 125 U/ml) que se dejó actuar 2 horas antes de agregar la DL 50 de cada uno de los fármacos que había sido calculada

previamente. A las 24 horas del tratamiento se realizó una prueba de MTT para evaluar la viabilidad celular.

### **5.5 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA.**

Se sembraron las células a una densidad de 25,000/200 $\mu$ l en placas de 96 pozos. Después de dos horas de incubación se agregó lovastatina (Liperol®, Rayere Farmacéuticos) (apéndice) a una concentración de 20  $\mu$ M y se dejó actuar por 20 horas. Posteriormente se adicionó la rhEpo (Bioyetin®, Probiomed o Sigma-Aldrich (apéndice)) (0 y 250 U/ml) y se incubó por 2 horas. Finalmente se adicionaron las DL 50 de los quimiofármacos. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT para obtener la viabilidad celular.

### **5.6 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE JAK 2.**

Las células se sembraron a una densidad de 25,000/200  $\mu$ l en placas de 96 pozos. Luego de dos horas de incubación, se agregó el inhibidor AG 490/Tirfostina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 250  $\mu$ M. El inhibidor se dejó actuar por 16 horas luego de las cuales se adicionó la rhEpo (Bioyetin®, Probiomed o Sigma-Aldrich) (0 y 250 U/ml). Después de incubar por dos horas, se adicionó la DL 50 de los fármacos. Se realizó una prueba de MTT a las 24 horas para obtener la viabilidad celular.

## **5.7 ENSAYOS DE RESISTENCIA.**

Monocapas de células fueron incubadas con 0 y 125 U/ml de rhEpo (Eprex®, Janssen-Cilag) por dos horas. Posteriormente se adicionaron las DL 50 de los diferentes quimiofármacos. A las 24 horas, las células sobrevivientes fueron lavadas varias veces con PBS y colectadas para ser resembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 50,000 células/200µl. Luego de dos horas de incubación, las células recibieron nuevamente la DL 50 de los fármacos de los cuales habían sobrevivido previamente. A las 24 horas se realizó un ensayo de MTT para obtener la viabilidad celular.

## **5.8 ENSAYO DE TUNEL**

Los reactivos utilizados en el ensayo de TUNEL fueron de la marca Roche. Las células se crecieron en portaobjetos colocados en placas de 24 pozos. Transcurridos 3 días, se dio el tratamiento con eritropoyetina (Biotin®, Probiomed) (0 y 250 U/ml) que se dejó actuar por 2 horas y posteriormente se adicionó la DL 50 de los fármacos como se describió anteriormente. A las 24 horas del tratamiento, el medio fue retirado y las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% preparado en PBS filtrado y con un pH de 7.4, por una hora, a temperatura ambiente. Las células se lavaron 2 veces con PBS y después fueron incubadas 2 minutos a 4 °C con una solución de triton x-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1% que había sido recién preparado. Luego, se lavaron dos veces con PBS y se agregaron 50 µl de la solución de reacción (45 µl de dUTPs acoplados al fluorocromo fluoresceína + 5 µl de la enzima TdT). La

solución se dejó actuar por 1 hora en la obscuridad a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Las preparaciones se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss con una excitación de 450 nm. Se analizaron 100 células de 5 campos distintos de cada preparación y se reportó el porcentaje promedio de células muertas.

### **5.9 ENSAYO DE INCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO.**

Debido a que la doxorubicina posee fluorescencia propia (cuando se excita con 450 nm hasta 490 nm, Shinozawa *et al.*, 1981; Veldman *et al.*, 2005) y cuya longitud de emisión es de 580 nm (Van Raalte *et al.*, 1990) lo que podría interferir en los resultados del ensayo de TUNEL pues la fluoresceína utilizada en éste tiene una longitud de emisión de 521 nm, se utilizó el método de inclusión de azul tripano para evaluar el número de células muertas luego del tratamiento con doxorubicina en presencia o ausencia de eritropoyetina.

Se sembraron 1,000,000 de células en placas de 6 pozos. A las 24 horas se dio el tratamiento con rhEpo (Bioyotin®, Probiomed) (0 y 250 U/ml) que se dejó actuar por dos horas antes de adicionar la DL 50 de cisplatino (que se utilizó como control) o de doxorubicina. A las 24 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y se cosecharon con 500 µl de PBS y un raspador. Luego se centrifugó 5 minutos a 3,000 rpm. El pellet se resuspendió en 500 µl de PBS y se añadieron 500 µl de solución de azul tripano que se encontraba a una concentración de 0.4% (preparado en 0.81% de cloruro de sodio y 0.06% de fosfato de potasio según

información de Sigma-Aldrich). Transcurridos 5 minutos, se tomaron 10  $\mu$ l y se colocaron en un hemocitometro. Se contó el número de células muertas (azules, pues en ellas inclusionó el azul tripano) en cada uno de los 4 cuadrantes de las esquinas y en base al número total de células que había en dichos cuadrantes, se obtuvo el porcentaje de células muertas.

#### **5.10 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EPO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR CISPLATINO Y DOXORUBICINA *IN VIVO*.**

Se utilizaron ratones nu/nu atímicos (para que no rechazaran las células inoculadas pues estas procedían de una especie distinta) hembras de 8 semanas que fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubirán. Grupos de 5 ratones fueron inoculados subdérmicamente con 500,000 células HeLa en 100  $\mu$ l de PBS en el costado superior izquierdo. Luego de 3 semanas, se midieron las masas tumorales (largo x ancho x alto) con un vernier y se comenzó a dar el tratamiento correspondiente. El grupo 1 recibió únicamente solución salina intraperitoneal y se utilizó para medir el crecimiento natural de los tumores. El grupo 2 recibió 500 U/Kg de eritropoyetina (Bioyotin®, Probiomed) 2 veces por semana de manera subdérmica en regiones cercanas a la masa tumoral. El grupo 3 recibió cisplatino intraperitoneal una vez por semana en una dosis de 6 mg/Kg. El grupo 4 recibió 12 mg/Kg de doxorubicina intraperitoneal una vez por semana. El grupo 5 recibió el tratamiento de Epo junto con el de cisplatino y el último grupo recibió Epo en conjunto con la doxorubicina. Los tratamientos se administraron por un período de 6 semanas. Los



tumores fueron medidos cada semana a las 24 horas de administrado el tratamiento con los quimiofármacos.

Los esquemas de tratamiento están basados en los utilizados en pacientes humanos. Las dosis de los quimiofármacos, están reportadas como dosis seguras para el animal, es decir, que no provocan daños renales, hepáticos, cardíacos ni pérdida del apetito (Gao *et al.*, 2006; Cemazar *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2007). El régimen empleado de la rhEpo se utilizó en base a lo recomendado para pacientes en los que se desea mantener el nivel de hemoglobina por encima de los 12 g/dl (Janssen-Cilag) y la dosis utilizada no induce eventos de trombosis, siendo segura para los animales (Stüben *et al.*, 2001; Stüben *et al.*, 2003).

Al inicio del estudio, no todas las masas tumorales tenían el mismo volumen pero los grupos de ratones se formaron con animales cuyas masas tumorales eran de volumen similar para así poder promediar y graficar los resultados. Los resultados fueron reportados como el número de veces que los tumores aumentaron o disminuyeron su volumen.

#### **5.11 DETERMINACIÓN DE LA CASPASA 3 ACTIVA.**

Se utilizó el kit de BioVision Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit. Brevemente, se sembraron 1,000,000 de células en placas de 6 pozos y se dejaron crecer por 24 horas. Luego de esto, se trataron con rhEpo (Bioyotin®, Probiomed y Sigma-Aldrich) (0 y 250 U/ml) que se dejó actuar por dos horas luego de las cuales se añadió la DL 50 de los fármacos. A las 24 horas del tratamiento se extrajo la proteína total. Para extraer la proteína total, las células se lavaron 2

veces con PBS frío y después se colectaron con raspador en 500  $\mu$ l de PBS frío. Se centrifugó 5 minutos a 5,000 rpm en una micro centrífuga Eppendorf mini-spin a 4 °C. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer de lisis (BioVision CA) (apéndice) y se dejó incubar 10 minutos en hielo. Pasado el tiempo, se centrifugó 1 minuto a 12,500 rpm a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf nuevos. Las muestras se almacenaron en un ultracongelador Sanyo a -80 °C. La concentración total de proteína se determinó mediante el kit Bio-Rad DC Protein Assay (el cuál esta basado en el método de Lowry, que detecta principalmente aminoácidos como la tirosina, el triptófano y en menor medida la cistina, la cisteína y la histidina).

Se tomaron 120  $\mu$ g de proteína de cada muestra, los cuales fueron incubados con el substrato de caspasa 3 contenido en el kit por dos horas a 37 °C. Posteriormente, las muestras se analizaron en un lector de placas a 405 nm. Los datos se reportaron como densidad óptica. La densidad óptica se relaciona de manera directamente proporcional con la cantidad de caspasa 3 activa.

## **5.12 ENSAYOS DE DETECCIÓN DE SENESCENCIA.**

Se utilizó el kit de BioVision Senescence Detection Kit, el cuál está basado en la detección de la  $\beta$ -galactosidasa celular. Se sembraron 700,000 células en portaobjetos dentro de placas de 12 pozos y se dejaron crecer por 3 días. Transcurrido este tiempo, se dio el tratamiento con rhEpo (Biyetin®, Probiomed) (0 y 250 U/ml) y la dosis letal media de los fármacos como se indicó anteriormente. A las 24 horas, se retiró el medio y las células se lavaron una vez

con PBS para después ser fijadas con solución fijadora (apéndice) por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavó dos veces con PBS y se agregó la mezcla para tinción (470  $\mu$ l solución de tinción + 5  $\mu$ l suplemento de tinción + 25  $\mu$ l solución X-Gal) (apéndice) y se incubó por toda la noche a 37 °C en la obscuridad. Las muestras se cubrieron con glicerol al 70 % y fueron almacenadas a 4 °C para su posterior análisis en el microscopio. Las células positivas se observan de color azul debido a que las células senescentes contienen mayor cantidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que las células no senescentes, además de expresarse constitutivamente, y esta enzima, corta su substrato artificial, el X-Gal que fue agregado durante el método. Cuando los productos del corte del X-Gal se oxidan, se obtiene el color azul que se observa. Se analizaron 100 células de 5 campos distintos de cada preparación y se reportó el porcentaje promedio de células positivas (senescentes).

### **5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica versión 6 (StatSoft). Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas si  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

### 6.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 DE LOS QUIMIOFÁRMACOS

El primer objetivo fue determinar la dosis de cada uno de los quimiofármacos que induce la muerte del 50% de las células (dosis letal 50 o DL 50) en los cultivos de las tres líneas celulares utilizadas. Para esto se expuso a las células a concentraciones crecientes de cada fármaco por 24 horas y se evaluó el porcentaje de viabilidad respecto al control. Los datos obtenidos fueron analizados mediante una regresión lineal para el cálculo de la DL 50. Los resultados para cada fármaco y línea celular se presentan en la tabla 2. Las DL 50 presentadas en la tabla son las que se utilizaron a lo largo de este trabajo.

**Tabla 2. Dosis letal 50 de los quimiofármacos.**

QUIMIOFÁRMACO	DOSIS LETAL 50 ( $\mu$ M)		
	HeLa	SiHa	C33
<b>Cisplatino</b>	11.6	16.6	36.6
<b>Paclitaxel</b>	0.585	0.644	5.85
<b>Tamoxifén</b>	30.9	26.9	26.9
<b>Doxorubicina</b>	73.6	174	128

## **6.2 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS PREVENTIVOS DE LA rhEpo SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR LOS QUIMIOFÁRMACOS**

Existen reportes que muestran un efecto protector de la eritropoyetina exógena cuando es administrada como terapia para corregir la anemia en los pacientes con cáncer (Henke *et al.*, 2006; Saintigny *et al.*, 2007). Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue el de evaluar si la rhEpo es capaz de proteger a células derivadas de carcinoma cervical de la muerte por fármacos que actúan de distinta manera. Los fármacos estudiados fueron cisplatino, doxorubicina (inductores de apoptosis), paclitaxel (inductor de catástrofe mitótica) y tamoxifén (inductor de autofagia). Aunque como se mencionó anteriormente el tamoxifén no se utiliza para tratar el cáncer cervicouterino, en este trabajo se utilizó por ser un inductor de autofagia, otro tipo de muerte celular sobre el cuál se deseaba estudiar el efecto de la rhEpo. Con la finalidad de estudiar si la rhEpo era capaz de prevenir la muerte celular, se estimuló con diferentes concentraciones de rhEpo antes de administrar la DL 50 de los fármacos y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Para el caso de cisplatino se encontró que conforme se aumentó la cantidad de rhEpo, aumentó el porcentaje de viabilidad celular (Figura 5). En la línea celular HeLa (Figura 5 A), a partir de 15 U/ml de rhEpo, se obtuvieron efectos preventivos ( $P < 0.05$ ) y a partir de 60 U/ml de rhEpo, se obtuvo mayor viabilidad celular que en el control ( $P < 0.05$ ), lo que sugiere que la rhEpo además de prevenir al 100% de las células de la muerte por cisplatino, induce proliferación celular. En contraste, en la línea celular SiHa, nunca se logró la prevención de la muerte del 100% de las células, ni con la dosis máxima empleada que fue de 125 U/ml. Sin embargo, la prevención fue significativa a partir de 15 U/ml ( $P < 0.05$ )

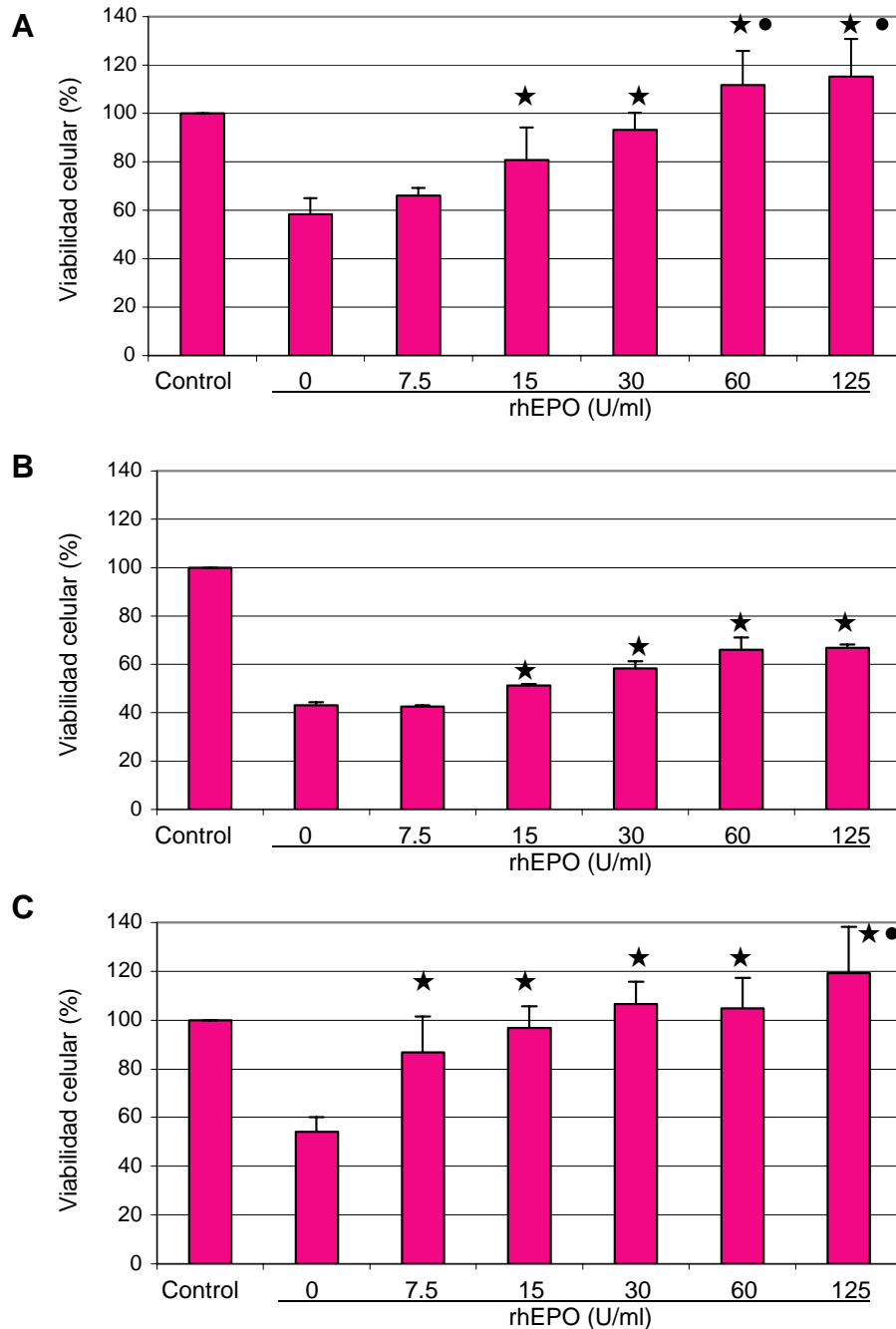
(Figura 5B). El efecto preventivo se observó de igual manera en la línea celular C33 ( $P < 0.05$  para todas las concentraciones de rhEpo) (Figura 5 C) y con 125 U/ml de rhEpo se observó más viabilidad celular que en el control ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, el efecto preventivo de la rhEpo también se observó sobre la muerte inducida por paclitaxel (Figura 6) sin embargo, en ningún caso logró prevenir la muerte del 100% de las células. En la línea celular HeLa (Figura 6 A) a partir de 15 U/ml se tienen efectos preventivos ( $P < 0.05$ ). La línea celular SiHa es la excepción, pues no hubo prevención de la muerte por paclitaxel (Figura 6 B) ( $P > 0.05$ ). En C33 conforme aumenta la concentración de rhEpo aumenta la viabilidad celular, y la prevención es significativa a partir de 15 U/ml de rhEpo aunque nunca se alcanza la prevención del 100% de las células (Figura 6 C).

El tercer fármaco estudiado fue el tamoxifén, y una vez más la rhEpo previno a la población celular de la muerte inducida por éste (Figura 7). En la línea celular HeLa, 125 U/ml de rhEpo previnieron la muerte del 100% de las células ( $P < 0.05$ ) (Figura 7 A). En la línea celular SiHa, la prevención fue significativa desde la dosis más pequeña de rhEpo que fue de 7.5 U/ml ( $P < 0.05$ ) y 30 U/ml son suficientes para prevenir la muerte del 97% de las células (Figura 7 B). En la línea celular C33, no hubo cambios significativos cuando se administró rhEpo (Figura 7 C).

Por último, y de suma importancia, no se encontró efecto preventivo de ninguna de las dosis de rhEpo sobre la muerte por doxorubicina en ninguna de las líneas celulares (Figura 8) ( $P > 0.05$ ). En la línea celular HeLa, cuando se administraron 125 U/ml de rhEpo se observó incluso que el efecto citotóxico de la doxorubicina aumentó ( $P < 0.05$ ) (Figura 8 A). Así mismo, en la línea celular SiHa, 7.5 U/ml de

rhEpo aumentaron los efectos citotóxicos del quimiofármaco ( $P < 0.05$ ) (Figura 8 B).

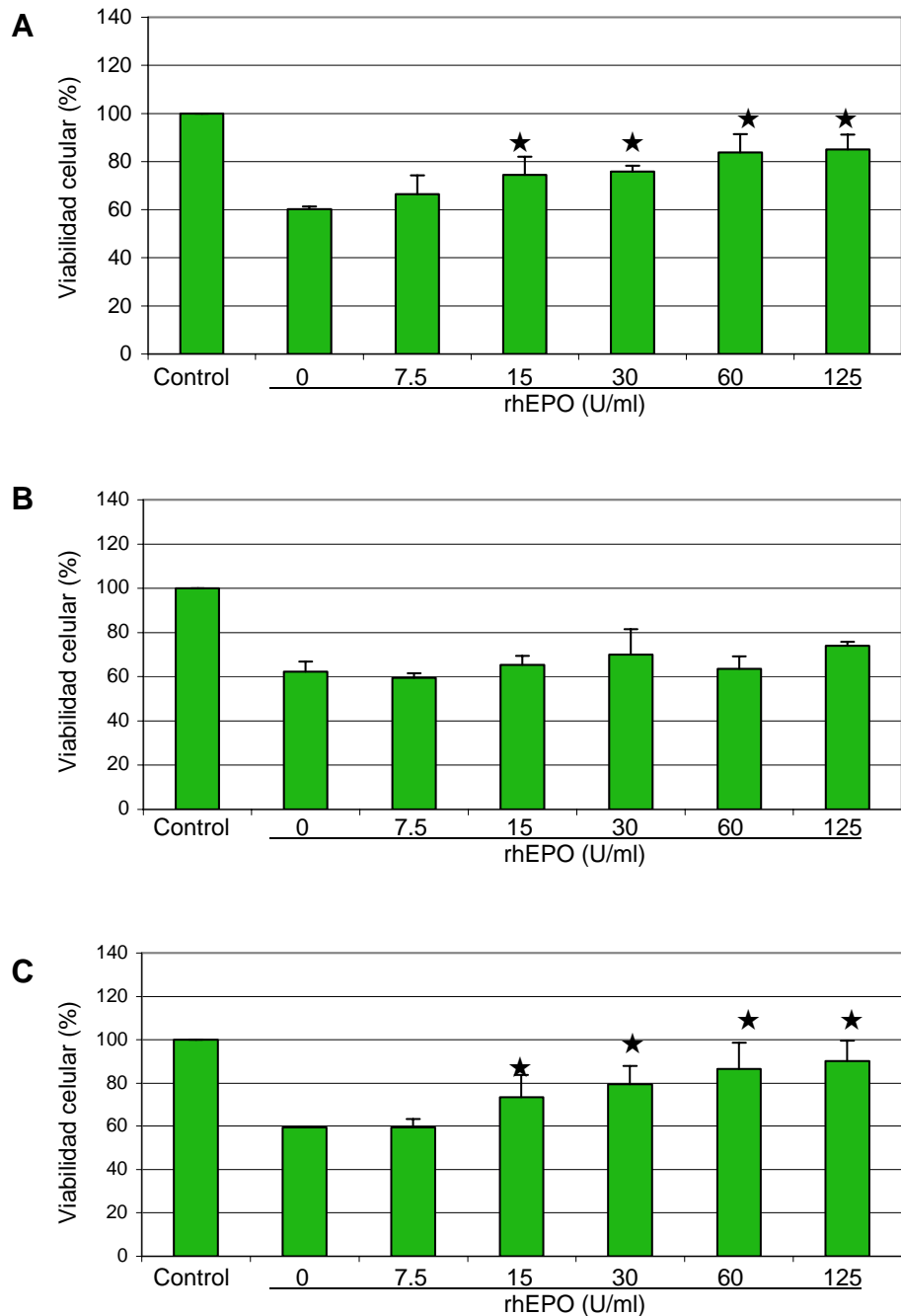


**Figura 5. Efecto de la rhEPO sobre la muerte inducida por cisplatino.**

Las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y C33 (C) fueron estimuladas con las dosis indicadas de rhEPO y 2 horas después recibieron la DL 50 de cisplatino para cada línea celular. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado con su desviación estándar. ★ P < 0.05 en comparación con la DL 50 y 0 U/ml de rhEPO.

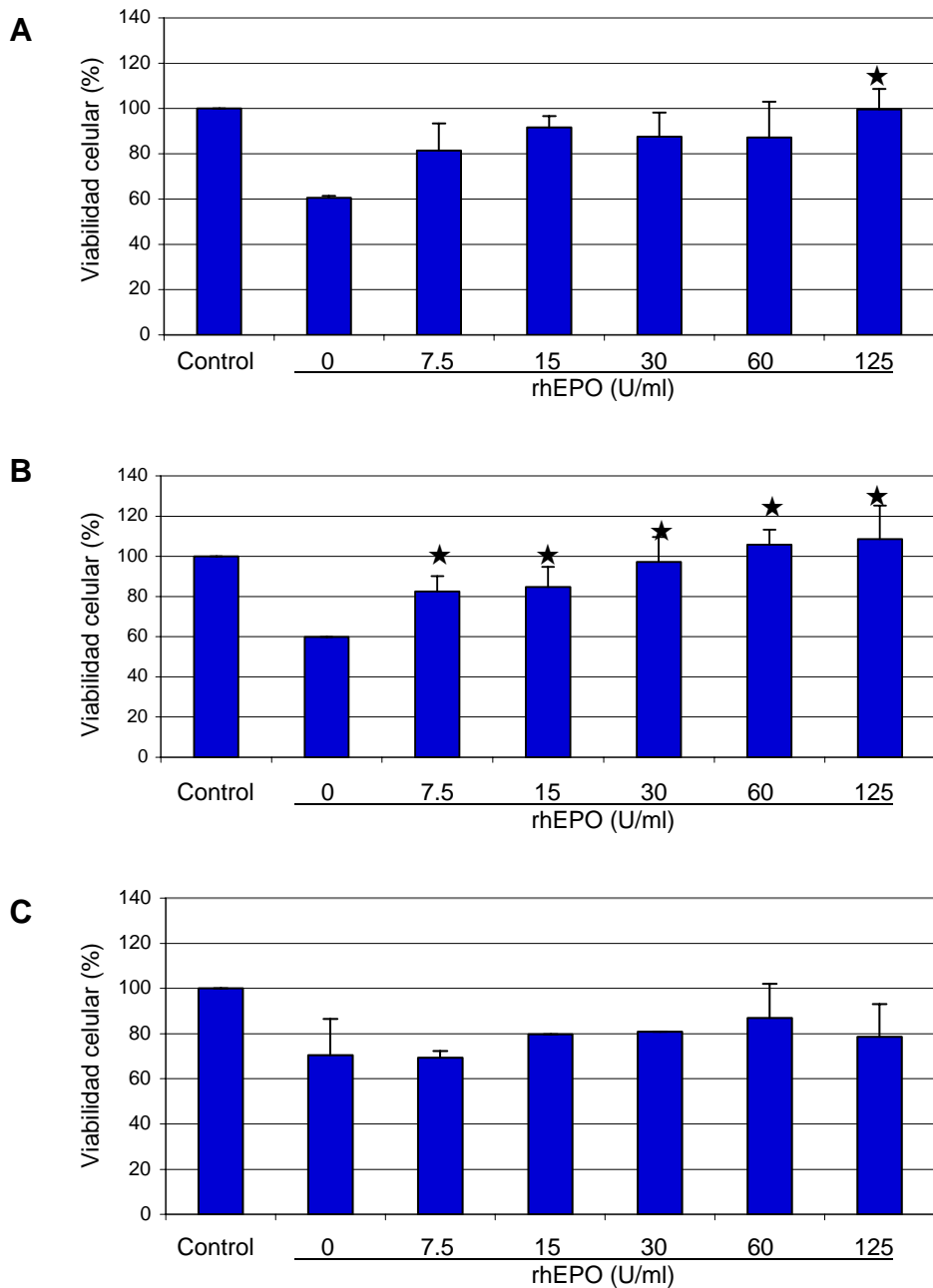
• Aumento significativo en comparación con el control (P < 0.05).





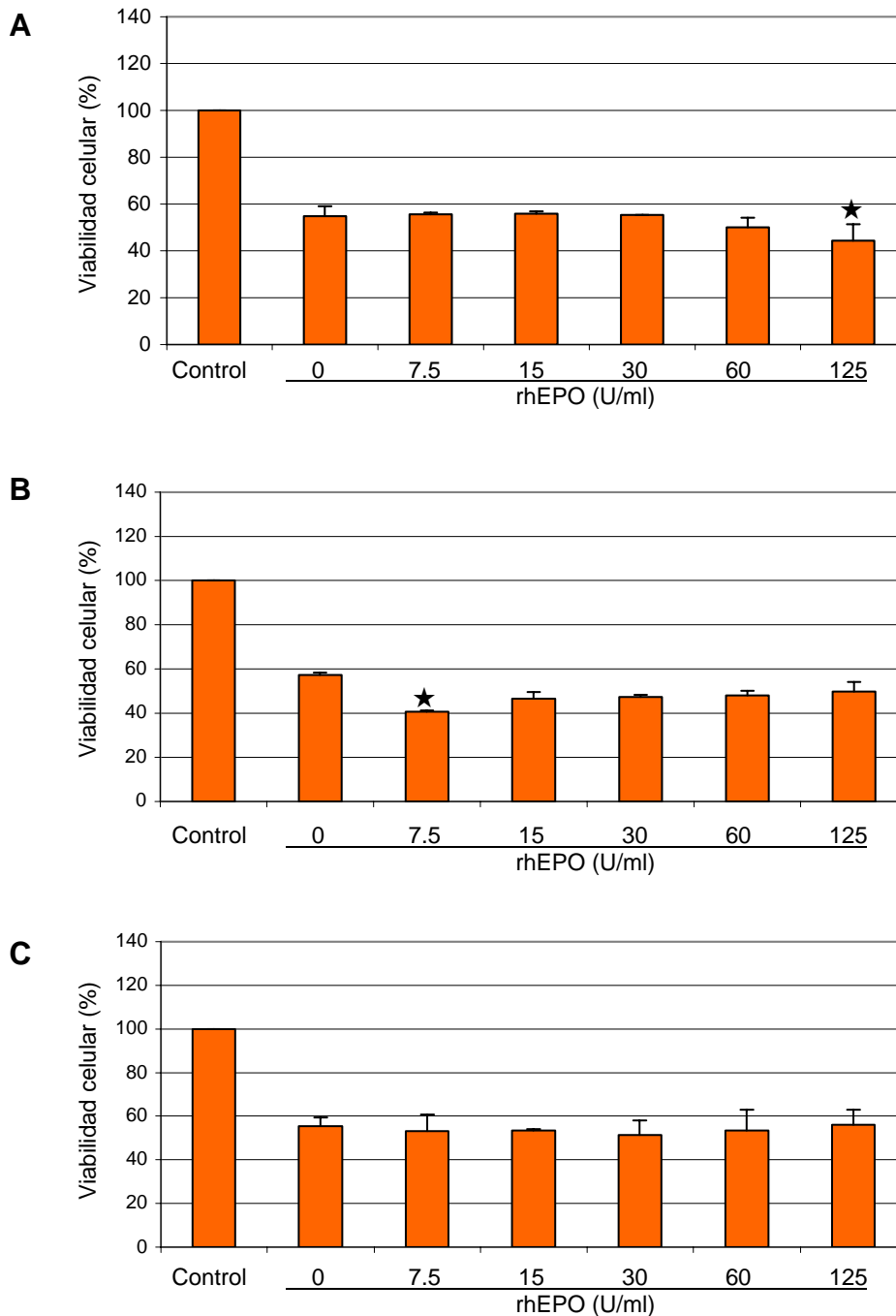
**Figura 6. Efecto de la rhEPO sobre la muerte inducida por paclitaxel.**

Las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y C33 (C) fueron estimuladas con las dosis indicadas de rhEPO y 2 horas después recibieron la DL 50 de paclitaxel correspondiente para cada línea celular. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado con su desviación estándar. ★  $P < 0.05$  en comparación con la DL 50 y 0 U/ml de rhEPO.



**Figura 7. Efecto de la rhEPO sobre la muerte inducida por tamoxifén.**

Las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y C33 (C) fueron estimuladas con las dosis indicadas de rhEPO y 2 horas después recibieron la DL 50 de tamoxifén correspondiente para cada línea celular. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado con su desviación estándar. ★ P < 0.05 en comparación con la DL 50 y 0 U/ml de rhEPO.



**Figura 8. Efecto de la rhEPO sobre la muerte inducida por doxorubicina.** Las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y C33 (C) fueron estimuladas con las dosis indicadas de rhEPO y 2 horas después recibieron la DL 50 de doxorubicina correspondiente para cada línea celular. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado con su desviación estándar. ★ P < 0.05 en comparación con la DL 50 y 0 U/ml de rhEPO.

### **6.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE rhEPO SOBRE LA MUERTE DE CÉLULAS TUMORALES MEDIADA POR CISPLATINO Y DOXORUBICINA EN UN MODELO MURINO**

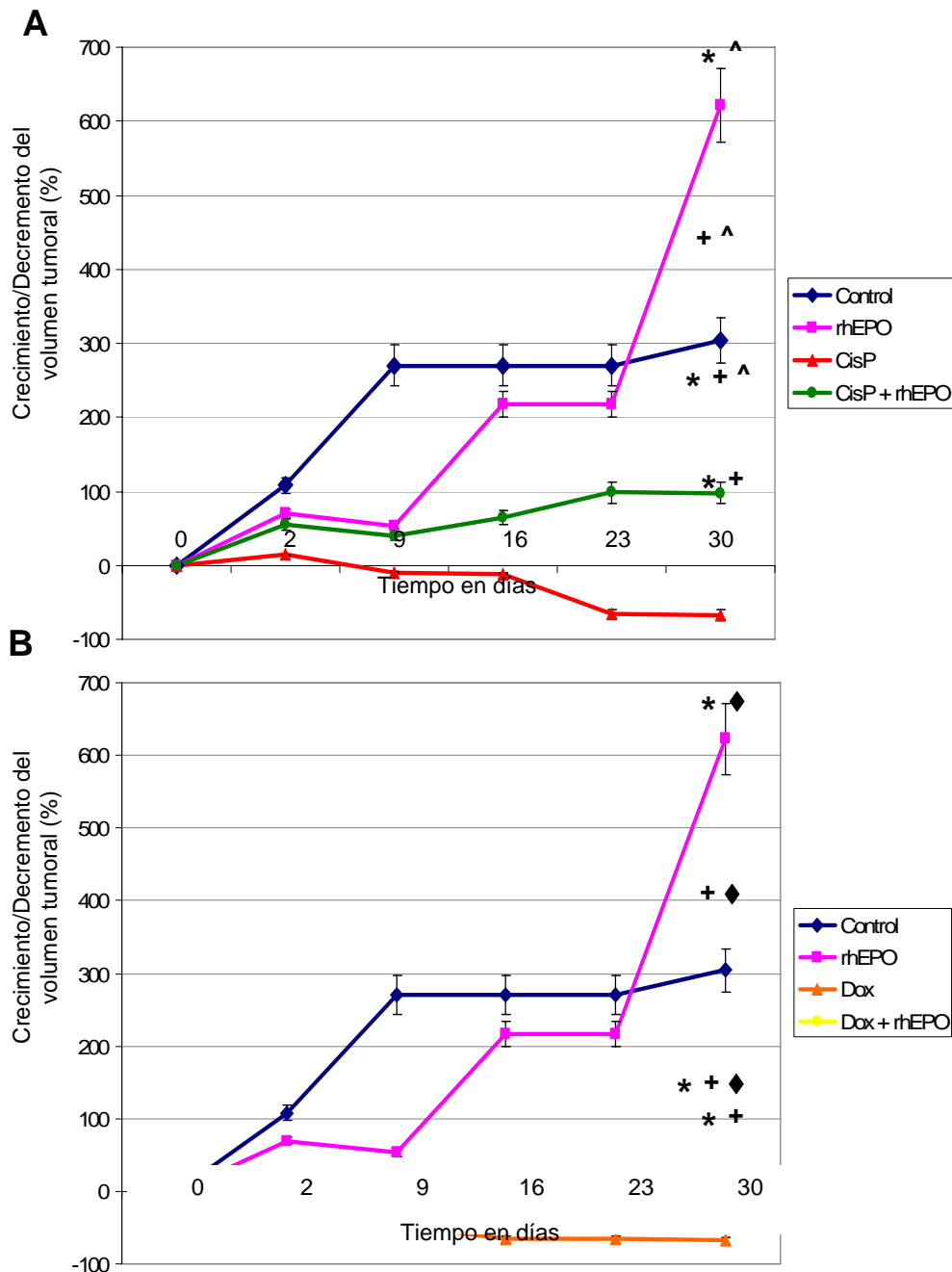
Los análisis anteriores realizados *in vitro*, mostraron que la administración de rhEpo en conjunto con algunos quimiofármacos puede tener efectos preventivos sobre la muerte inducida por éstos, por lo que se decidió evaluar dicho efecto *in vivo* utilizando un modelo murino. Los quimiofármacos utilizados para este estudio fueron el cisplatino y la doxorubicina. El cisplatino se utilizó debido a que es el fármaco utilizado como quimioterapia base en los tumores cervicales y porque la rhEpo resultó tener efectos preventivos sobre la muerte que éste induce. La doxorubicina se consideró para este estudio ya que de los quimiofármacos estudiados en este trabajo fue el único sobre el cuál la rhEpo no tuvo un efecto preventivo. Para estos ensayos se indujo el crecimiento de tumores en ratones atímicos mediante la inoculación de células HeLa como se describió en la sección de materiales y métodos. Cada grupo estaba formado por 5 ratones.

Como se muestra en la figura 9, los tumores de los ratones control, que únicamente recibieron solución salina, presentaron un crecimiento continuo hasta el noveno día, y a lo largo del experimento, nunca redujeron su volumen. Los tumores del grupo de animales que recibió únicamente rhEpo incrementaron su volumen a lo largo del experimento y la tasa de crecimiento de este último grupo fue mayor que la que presentó el grupo control ( $P = 0.045$ ).

Los tumores del grupo que recibió únicamente tratamiento con cisplatino redujeron su volumen al final del experimento ( $P < 0.01$ ), en cambio, los tumores de los animales que recibieron rhEpo junto con el cisplatino se comportaron de forma

semejante a los del grupo control y nunca disminuyeron su volumen por debajo del volumen inicial, presentándose en este grupo la muerte de un animal (Figura 9 A). Por lo tanto, los efectos protectores observados de la rhEpo *in vitro* sobre la muerte mediada por cisplatino se repitieron en este ensayo *in vivo*.

Por otro lado, los tumores tratados con doxorubicina presentaron un decremento significativo en su volumen con respecto a los controles ( $P < 0.01$ ) y los que solo recibieron rhEpo ( $P < 0.01$ ). Como se observa en la figura 9B, el tratamiento conjunto de doxorubicina y rhEpo indujo un decremento significativo del volumen tumoral con respecto al mostrado por el grupo control ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, el efecto de la doxorubicina fue menor cuando se administró en conjunto con rhEpo que cuando se aplicó sola. Estos resultados sugieren que existe un efecto preventivo de la rhEpo sobre la muerte inducida por doxorubicina *in vivo* que no se observa en estudios *in vitro*.



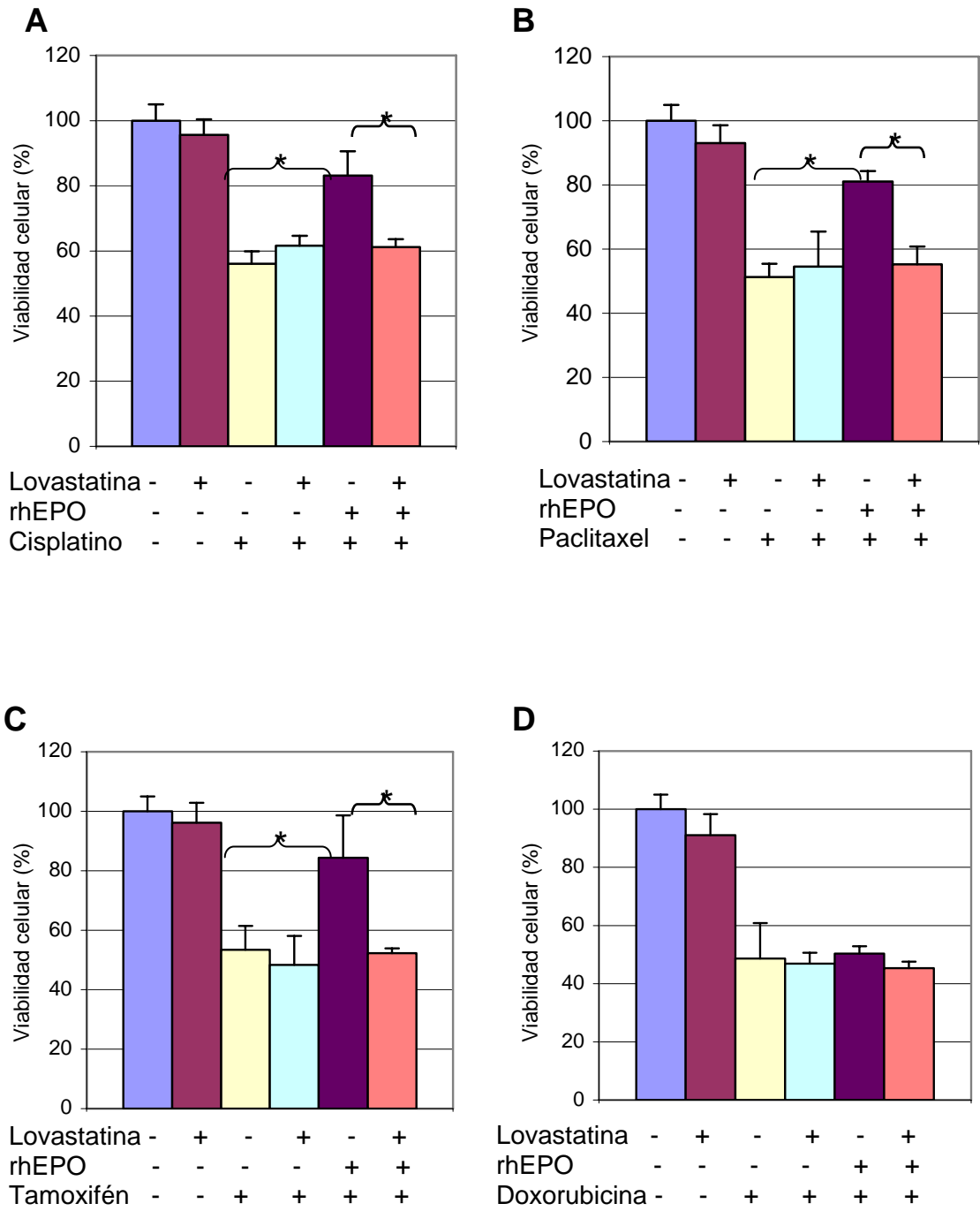
**Figura** **to con**  
**cisplatino y doxorubicina de tumores en un modelo murino.**

Grupos de 5 ratones atímicos fueron inoculados con 500,000 células HeLa. Después de 3 semanas los ratones fueron tratados con cisplatino, cisplatino + rhEPO, doxorubicina y doxorubicina + rhEPO, rhEPO o bien con solución salina como control negativo. Los quimiofármacos y la solución salina fueron administrados intraperitonealmente y la rhEPO subcutáneamente. El desarrollo de los tumores fue monitoreado el día 2 y posteriormente cada 7 días. Cada punto representa el promedio del número de veces que aumentó o disminuyó el volumen tumoral con su desviación estándar. \* P < 0.05 con respecto al grupo control. + P < 0.05 con respecto al grupo rhEpo. ^ P < 0.05 con respecto al grupo cisplatino. ◆ P < 0.05 con respecto al grupo doxorubicina.

#### **6.4 INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA CON LOVASTATINA**

Los resultados obtenidos sugieren que la rhEpo tiene un efecto preventivo sobre la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén. Para demostrar que dicho efecto es mediado por el receptor para Epo, se realizaron ensayos de inhibición de la expresión del mismo utilizando lovastatina. La lovastatina es un miembro de los medicamentos conocidos como estatinas. Las estatinas son un grupo de medicamentos empleados para tratar la hipercolestemia que inhiben la enzima reductasa de HMG-CoA (Coenzima A de 3 hidroxil-3 metilglutaril). Al inhibir la reducción de HMG-CoA se inhibe la vía del mevalonato, lo que disminuye por un lado, la biosíntesis de colesterol y por otro, la producción de compuestos necesarios para la glicosilación y la geranilgeranilación de proteínas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Hamadmad *et al.*, 2007). La glicosilación y la geranilgeranilación son modificaciones post-traduccionales necesarias para la correcta maduración y expresión en la superficie celular del receptor de eritropoyetina (Yoshimura *et al.*, 1990; D' Andrea *et al.*, 1990; Hamadmad *et al.*, 2006).

Los resultados muestran que el efecto preventivo de la rhEpo sobre la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén se abate cuando la expresión del receptor para Epo es inhibido mediante el uso de lovastatina (Figura 10). Estos resultados indican que el efecto preventivo de la rhEpo es mediado por la interacción entre ésta y su receptor.

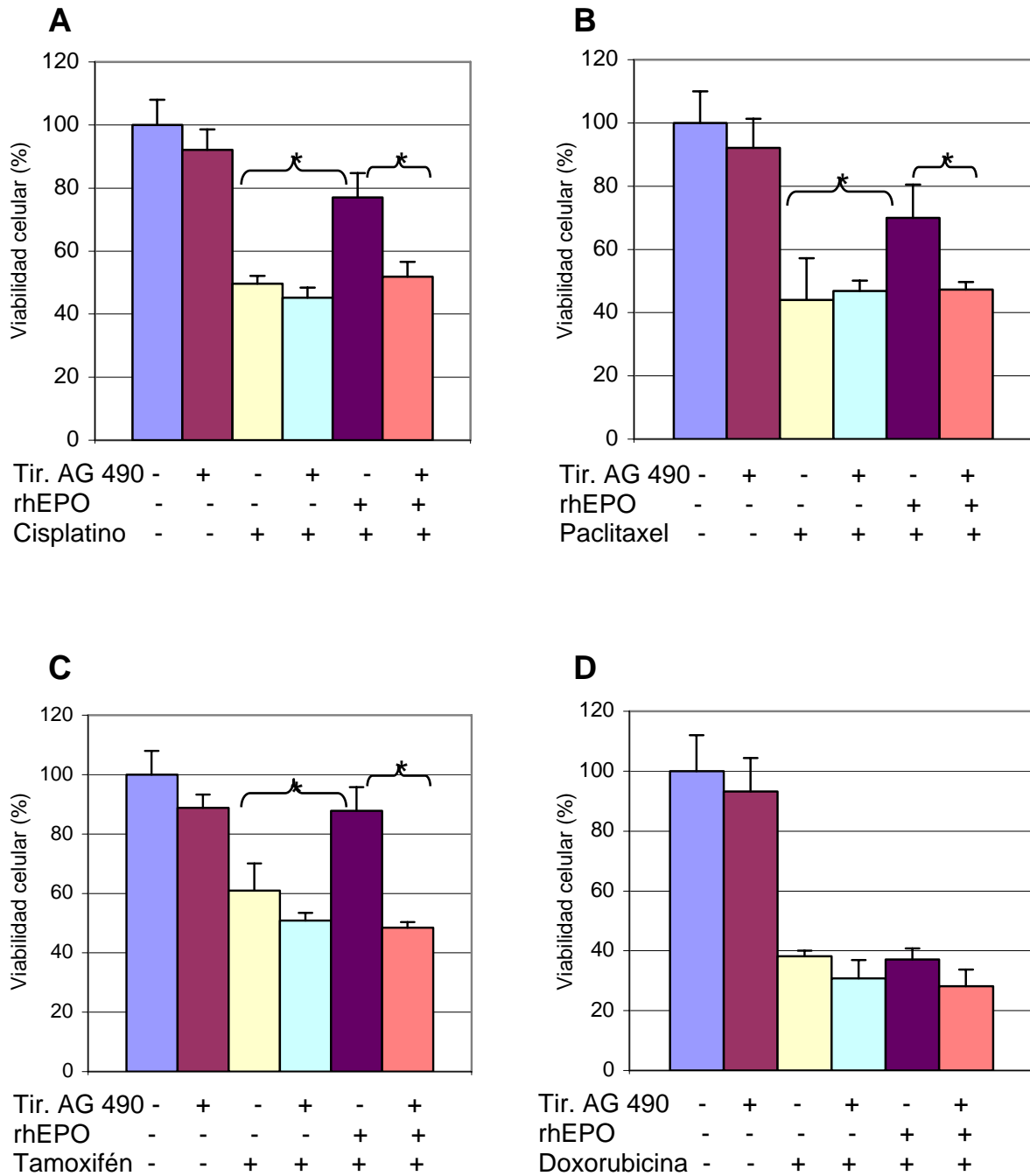


**Figura 10. Inhibición del receptor de rhEPO con lovastatina.**  
 Células HeLa fueron tratadas con 20  $\mu$ M de lovastatina por 20 horas. Después, las células recibieron rhEpo y 2 horas más tarde la DL 50 de cisplatino (A), paclitaxel (B), tamoxifén (C) y doxorubicina (D). A las 24 horas se realizó un ensayo de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. \* P < 0.05.



## **6.5 ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE JAK 2 EN LOS EFECTOS DE LA rhEPO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR CISPLATINO, PACLITAXEL Y TAMOXIFÉN.**

Nuestros resultados muestran que el efecto protector de la rhEpo sobre la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén se debe a la unión de la rhEpo a su receptor (EPO-R). Por otro lado, se sabe que la unión de la Epo a su receptor, el cual existe como un homodímero preformado (Rossert *et al.*, 2005), induce que las dos regiones citoplásmicas de dicho receptor se aproximen más entre si, lo cuál a su vez, permite que las moléculas de JAK 2 que se encuentran en estas regiones queden lo suficientemente cerca y se transfosforilen. Una vez fosforiladas, estas moléculas de JAK 2 son capaces de fosforilar al EPO-R con lo que éste queda activado (Witthuhn *et al.*, 1993). Una vez activado, el EPO-R es capaz de activar diversas vías de señalización implicadas en procesos de proliferación e inhibición de la muerte celular. Por lo tanto, para determinar si el efecto protector inducido por la rhEpo es mediado por JAK 2, se inhibió dicha molécula con Tirfostina AG 490, la cual es capaz de inhibir moléculas JAK bloqueándolas al unirse a ellas. Cuando se inhibió a JAK 2 antes de los tratamientos, se obtuvo que la prevención que genera la rhEpo sobre la muerte por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén se abate, lo cual sugiere que JAK 2 es necesaria para mediar las vías de señalización implicadas en el efecto preventivo observado luego de la unión de la Epo exógena a su receptor (Figura 11).



**Figura 11. Inhibición de JAK 2 con Tirfostina AG 490.**

Células HeLa fueron tratadas con 250  $\mu$ M de Tirfostina AG 490 por 16 horas. Después, las células recibieron rhEPO y 2 horas más tarde la DL 50 de cisplatino (A), paclitaxel (B), tamoxifén (C) y doxorubicina (D). A las 24 horas se realizó un ensayo de MTT.

Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. \*  $P < 0.05$ .

## **6.6 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA rhEPO SOBRE LA APOPTOSIS MEDIANTE EL MÉTODO DE TUNEL**

Luego de encontrar que la rhEpo protege de la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel, tamoxifén y sabiendo que los quimiofármacos utilizados en este trabajo pueden producir diferentes tipos de muerte celular, se decidió evaluar la apoptosis utilizando el ensayo de TUNEL. Este ensayo permitió conocer si los quimiofármacos producen apoptosis en células derivadas de carcinoma cervical como HeLa y si la rhEpo influye sobre este tipo de muerte en particular. Se debe señalar que el ensayo del TUNEL también es capaz de detectar células necróticas.

En los cultivos sin tratamiento se observó un número basal de células muertas que correspondió a un 11%. El número de células muertas incrementó hasta 19% cuando se administró rhEpo ( $P = 0.0474$ ) (Figura 12 A).

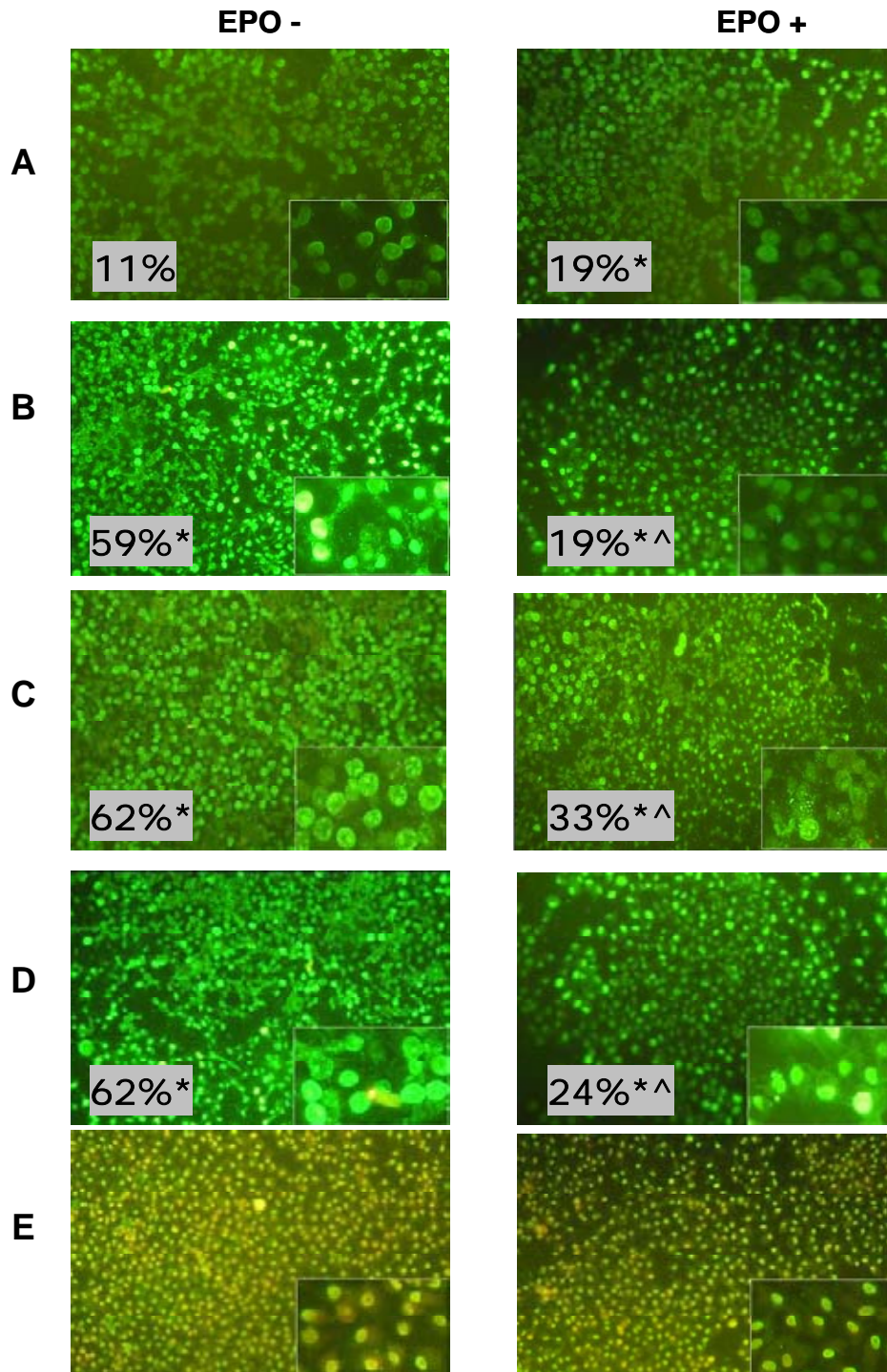
El tratamiento con cisplatino elevó el porcentaje de células muertas hasta un 59% ( $P = 0.0001$ ). Sin embargo cuando las células fueron pre-tratadas con rhEpo el porcentaje de células muertas fue solo del 32% ( $P = 0.0015$ ). Esto indica que el cisplatino induce apoptosis y/o necrosis y que la rhEpo bloquea este tipo de muerte celular (Figura 12 B). Según lo reportado, la dosis de cisplatino empleada aquí, es inductora de apoptosis.

De la misma forma, el paclitaxel elevó el número de células muertas hasta un 62% ( $P = 0.0001$ ) mientras que el pre-tratamiento con rhEpo redujo el porcentaje de muerte a 33% ( $P = 0.0005$ ) (Figura 12 C).

Por otro lado, los cultivos tratados con tamoxifén mostraron un 62% de células muertas ( $P = 0.0001$ ), y el porcentaje disminuyó hasta un 24% de células muertas

cuando se estimuló previamente con rhEpo ( $P = 0.0007$ ), mostrando así que la rhEPO protege a las células de la muerte por apoptosis y/o necrosis inducida por tamoxifén (Figura 12 D).

Ahora bien, la doxorubicina posee fluorescencia propia (Minchinton *et al.*, 2006) (Figura 12 E) y la técnica de TUNEL se basa justamente en el marcaje fluorescente de las células muertas, por lo tanto, se procedió a analizarlas mediante un ensayo de inclusión de azul tripano, el cual penetra sólo en las células en proceso de muerte que presentan perforaciones en su membrana citoplásmica y por lo tanto se tiñen de color azul. Se utilizaron 0 y 250 U/ml de rhEpo y las DL 50 de cisplatino y de doxorubicina en células HeLa. La tabla 3 muestra el promedio de 3 conteos independientes que se realizaron de las células muertas de cada grupo. De acuerdo con los resultados de esta prueba, la rhEpo es capaz de proteger a las células de muerte por cisplatino ( $P = 0.0105$ ) pero no induce protección sobre la muerte por doxorubicina tal y como se observó en las pruebas previas. Coincidentemente, en esta prueba se observó que el tratamiento con rhEpo previo a la doxorubicina aumenta el número de células muertas ( $P = 0.0194$ ) (Tabla 3).



**Figura 12. Efecto de la rhEPO sobre la muerte evaluado por TUNEL.**

Células HeLa recibieron 0 (EPO -) y 250 U/ml (EPO +) de rhEPO (A) y 2 horas después la DL 50 de los quimiofármacos cisplatino (B), paclitaxel (C), tamoxifén (D) o doxorubicina (E). 24 horas después se realizó un ensayo de TUNEL. Las células fluorescentes son células muertas (por apoptosis o necrosis). Se muestra el porcentaje de células muertas. \*  $P < 0.05$  con respecto al control. ^  $P < 0.05$  con respecto al grupo que no recibió rhEpo y solo la DL 50 del quimiofármaco correspondiente.

**Tabla 3. Evaluación del porcentaje de células muertas por el ensayo de inclusión de azul tripano.**

Fármaco	Células muertas (%) *	
	rhEPO (U/ml)	
	0	250
Cisplatino	53.64	39.30 ♦
Doxorubicina	47.30	55.16 ★

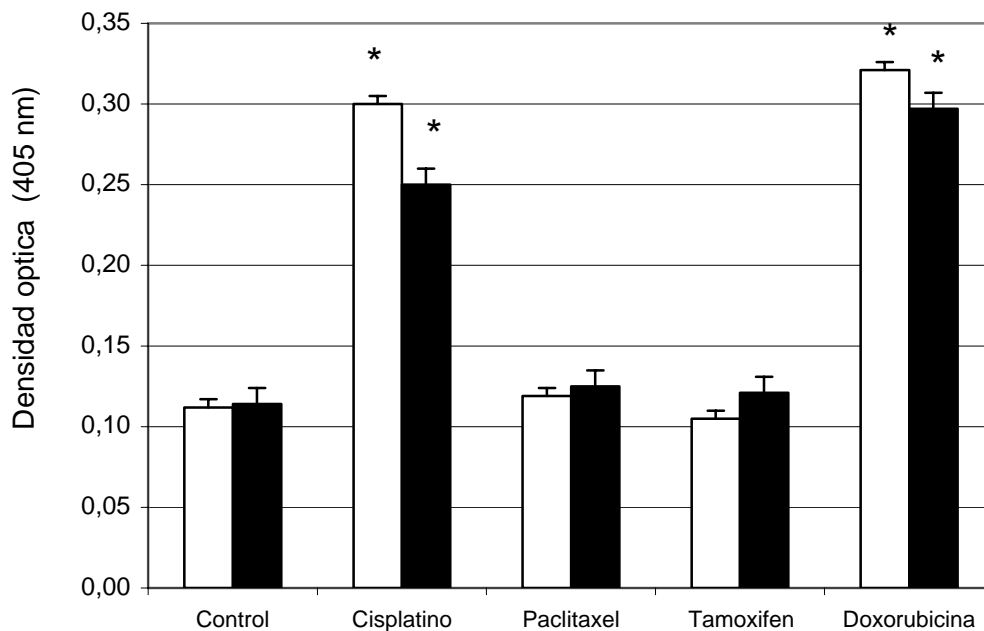
\*Se muestra el promedio de 3 conteos independientes. ♦P < 0.05 con respecto al grupo cisplatino. ★ P < 0.05 con respecto al grupo doxorubicina.

### 6.7 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE CASPASA 3 ACTIVA

Los resultados del ensayo de TUNEL mostraron que la rhEpo es capaz de inhibir la muerte por apoptosis y/o necrosis mediada por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén. Se sabe que un elemento clave en el proceso apoptótico es la activación de la caspasa efectora 3. Por otro lado se sabe que la Epo inhibe esta caspasa activando la vía PI3K/AKT (Spivak, 2005). Debido a lo anterior, se decidió evaluar la cantidad de caspasa 3 activa inducida por los diferentes tratamientos.

Los tratamientos con cisplatino y doxorubicina incrementaron 3 veces la cantidad de caspasa 3 activa con respecto a los niveles basales presentes en cultivos celulares sin tratar (P < 0.01) (Figura 13). Por el contrario el tratamiento con paclitaxel y tamoxifén, no produjo cambio en el nivel basal de caspasa 3 (P > 0.05), lo cual sugiere que la apoptosis mediada por estos quimiofármacos no depende de la activación de esta caspasa (Figura 13).

Interesantemente el pre-tratamiento con eritropoyetina redujo la cantidad de caspasa 3 activa inducida por cisplatino sólo un 17% ( $P = 0.0883$ ) y en el caso de la doxorubicina sólo un 10% ( $P = 0.0887$ ), esto parece sugerir que el efecto preventivo observado de la rhEpo sobre la muerte inducida por cisplatino no depende exclusivamente de la inducción de la inhibición de la actividad de esta caspasa y que la rhEpo podría inducir el bloqueo de otros elementos importantes en la muerte por este quimiofármaco.



**Figura 13. Determinación de caspasa 3 activa.**

Células HeLa recibieron únicamente la DL 50 de los quimiofármacos (barra blanca) o fueron pre-tratadas con 250 U/ml de rhEpo y posteriormente recibieron la DL 50 de los quimiofármacos (barra negra). A las 24 horas se extrajo la proteína total y se incubó con el sustrato de la caspasa 3 activa por dos horas. Después, se midió la absorbancia a 405 nm. Cada barra representa el promedio de 5 experimentos independientes por triplicado con su desviación estándar. \*  $P < 0.01$  con respecto al control.

## 6.8 EFECTO DE LA rhEPO SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR

Debido a que se ha sugerido que las células que sobreviven al tratamiento con paclitaxel y rhEpo están en un estado senescente (Hardee *et al.*, 2006), y sabiendo que algunos quimiofármacos como el cisplatino (Fang *et al.*, 2007; Sedletska *et al.*, 2005) y la doxorubicina (Elmore *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2007; Joyner *et al.*, 2006; Lanvers-Kaminsky *et al.*, 2005; Eom *et al.*, 2005; Rebbaa *et al.*, 2003) inducen senescencia en distintos tipos celulares, se evaluó la presencia de células senescentes detectando la sobre-expresión de la  $\beta$ -galactosidasa luego de los diferentes tratamientos en células HeLa. Los porcentajes que se mencionan a continuación son el promedio de 5 conteos que se realizaron de cada preparación y de 2 experimentos independientes.

Los cultivos de células sin tratamiento presentó el 33% de células en estado senescente y cuando se dio tratamiento con rhEpo el porcentaje aumentó a 65% ( $P = 0.0005$ ) (Figura 14 A).

El tratamiento con cisplatino no modificó el número basal de células senescentes (37%) ( $P = 0.0651$ ) y cuando se dio el pre-tratamiento con rhEpo, el porcentaje fue igual que el del grupo tratado sólo con rhEpo ( $P = 0.0705$ ). Estas observaciones indican que el cisplatino no induce senescencia celular (Figura 14 B).

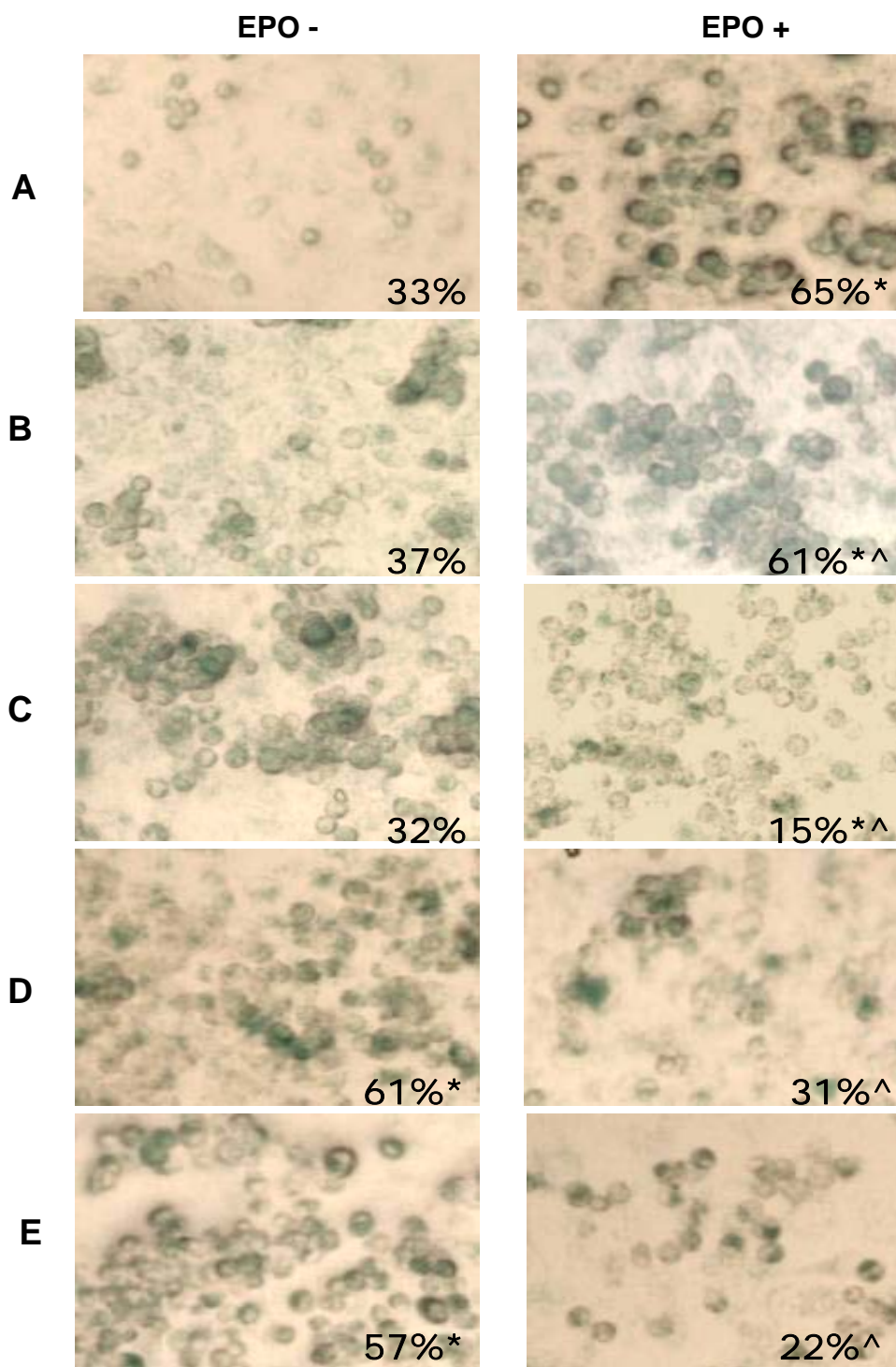
El tratamiento con paclitaxel tampoco produjo células senescentes ya que el porcentaje fue igual al del grupo control, 32% ( $P = 0.5614$ ). Sin embargo, cuando se pre-trataron las células con rhEpo, el número de células senescentes se redujo significativamente hasta 15% ( $P = 0.0007$ ), lo cual sugiere que el paclitaxel no



induce senescencia y que incluso inhibe la senescencia basal y la inducida por la rhEpo (Figura 14 C).

El tamoxifén por su parte, sí produjo células senescentes pues el porcentaje aumentó al 61% ( $P = 0.0043$ ). Cuando se pre-trató con rhEpo, el porcentaje de células senescentes se redujo a niveles basales (31%), lo que al parecer sugiere que, en este caso, es la rhEpo la que inhibe la senescencia inducida por el quimiofármaco (Figura 14 D).

Por último, el tratamiento con doxorubicina incrementó el porcentaje de células senescentes hasta un 57% ( $P = 0.0006$ ) e interesantemente, este porcentaje disminuyó hasta 22% cuando se pre-trataron las células con rhEpo ( $P = 0.0053$ ). Lo anterior indica que la doxorubicina incrementa el número de células senescentes pero la rhEpo es capaz de inhibir esta senescencia (Figura 14 E).



**Figura 14. Efecto de la rhEPO sobre la senescencia.**

Células HeLa recibieron 0 (EPO -) o 250 U/ml (EPO +) de rhEPO (A) y 2 horas después la DL 50 de los quimiofármacos cisplatino (B), paclitaxel (C), tamoxifén (D) o doxorubicina (E). 24 horas después se analizó la expresión constitutiva de la  $\beta$ -galactosidasa. Las células azules son células senescentes. \*  $P < 0.05$  con respecto al control. ^  $P < 0.05$  con respecto al grupo que no recibió rhEpo y solo la DL 50 del quimiofármaco correspondiente.

## **6.9 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA rhEPO PARA INDUCIR RESISTENCIA CELULAR A LOS QUIMIOFÁRMACOS**

Nuestros resultados muestran que la rhEpo es capaz de prevenir la muerte de las líneas celulares. Por otro lado, se ha reportado que la rhEpo es capaz de inducir resistencia a la radioterapia en células derivadas de carcinoma cervical (Belenkov *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha sugerido que una vez que se retira la rhEpo del cultivo, las células mueren como ocurre en el cultivo que no recibe el pre-tratamiento con rhEpo. Debido a estos hechos contrastantes, en este trabajo investigamos qué ocurría con las células que sobrevivían a los tratamientos con y sin rhEpo y si ésta sería capaz de inducir resistencia a los quimiofármacos.

Para este estudio se recuperaron las células que sobrevivieron a la administración de la DL 50 de cada quimiofármaco y se cultivaron nuevamente en presencia del mismo fármaco. De igual forma, las células pre-tratadas con rhEpo que sobrevivieron al quimiofármaco fueron colectadas e incubadas nuevamente en presencia del fármaco correspondiente.

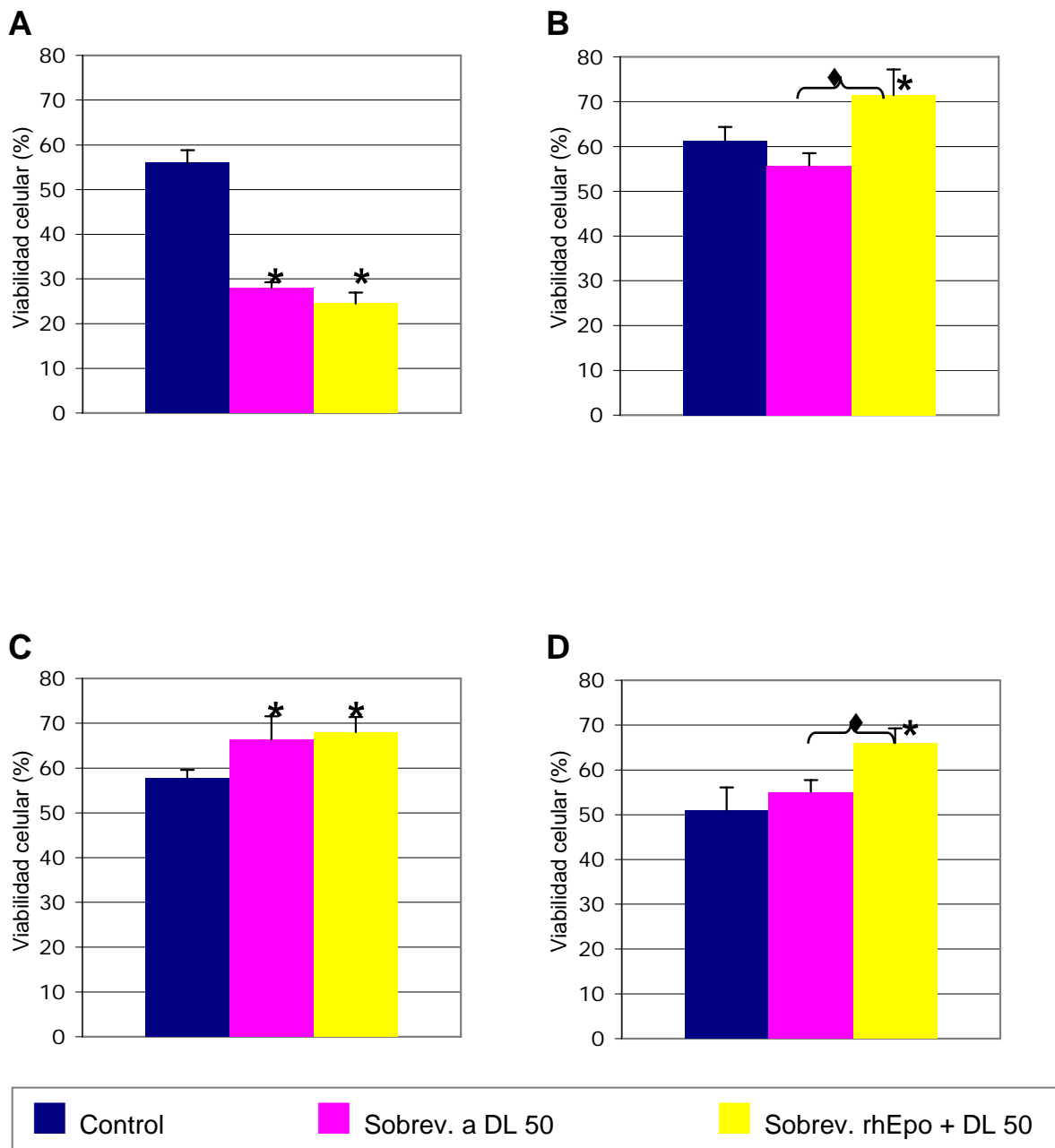
El re-tratamiento con cisplatino de las células que habían sobrevivido a la DL 50 de este fármaco indujo que sólo el 28% del cultivo sobreviviera, mientras que en las células sobrevivientes al pre-tratamiento con rhEpo y cisplatino la re-exposición a la DL 50 produjo el 24% de viabilidad celular (Figura 15 A). La viabilidad celular disminuyó en ambos casos significativamente en comparación con las células que recibieron la DL 50 por primera vez, en donde se obtuvo el 56% de viabilidad

celular. Estos resultados demuestran que la rhEpo no induce resistencia al tratamiento con cisplatino.

La re-exposición a la DL 50 de las células sobrevivientes al tratamiento con paclitaxel resultó en un 55% de viabilidad celular ( $P = 0.2321$ ). En cambio, en las células que sobrevivieron al pre-tratamiento con rhEpo y paclitaxel se observó la viabilidad del 71% del cultivo ( $P = 0.0405$ ), lo que sugiere que la rhEpo induce resistencia a la muerte por paclitaxel (Figura 15 B).

Las células que habían sobrevivido al tratamiento con tamoxifén y fueron re-expuestas, presentaron una viabilidad celular del 66% ( $P = 0.0413$ ) mientras que las células que habían sobrevivido al pre-tratamiento con rhEpo y tamoxifén presentaron una viabilidad del 68% del cultivo, lo que sugiere que la resistencia que se observa es consecuencia del propio quimiofármaco y no de la rhEpo (Figura 15 C).

Por último, se encontró que la re-exposición a la DL 50 de las células sobrevivientes a la doxorubicina produjo el 55% de viabilidad celular ( $P = 0.4395$ ). Por otro lado las células que sobrevivieron al pre-tratamiento con rhEpo y doxorubicina y fueron re-expuestas a la DL 50 alcanzaron un 66% de viabilidad celular ( $P = 0.0189$ ), lo que parece sugerir que la rhEpo induce una ligera resistencia a la doxorubicina (Figura 15 D).



**Figura 15. Efecto de la rhEPO sobre la adquisición de resistencia.**

50,000 células HeLa sobrevivientes al tratamiento con cisplatino (A), paclitaxel (B), tamoxifén (C) y doxorubicina (D), y células sobrevivientes que habían sido pre-tratadas con 250 U/ml de rhEpo, fueron re-expuestas a la DL 50 del quimiofármaco correspondiente. El porcentaje de viabilidad celular fue evaluado a las 24 hrs mediante la prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes con su desviación estándar. \*  $P < 0.05$  en comparación con el control (células sin tratamiento previo + la DL 50). ♦ Diferentes significativamente entre sí ( $P < 0.05$ ).

## VII. DISCUSIÓN

La quimioterapia del cáncer cervicouterino se basa en el uso de una serie de fármacos que tienen la capacidad de inducir la muerte de las células tumorales a través de diferentes mecanismos, siendo la apoptosis el más importante. En contraste, una de las funciones principales de la Epo es proteger a las células que expresan el EPO-R de la muerte por apoptosis (Spivak *et al.*, 1991). Dado que las células de cáncer cervicouterino expresan el EPO-R, en el presente trabajo investigamos si la rhEpo podría tener un efecto protector contra la muerte inducida por algunos de los quimiofármacos más comúnmente usados para el tratamiento del cáncer cervical.

Se probaron cuatro quimiofármacos: cisplatino, paclitaxel, tamoxifén y doxorubicina. La primera observación fue, que cuando se determinó la dosis letal 50 para el cisplatino, la línea celular HeLa requirió de una dosis menor en comparación con las líneas SiHa y C33 (Tabla 1). Lo mismo se presentó en el caso de la doxorubicina, lo que indica que las células que presentan VPH tipo 18 como las células HeLa, son más susceptibles a la muerte por estos quimiofármacos. Con respecto a lo anterior, se ha propuesto que la causa de esto es que las células con VPH-18 presentan mayor activación de la proteína p21 luego de los tratamientos con cisplatino y doxorubicina que las células que presentan VPH tipo 16 (Funaoka *et al.*, 1996). La proteína p21 es capaz de regular que el ciclo celular se detenga y que se induzca senescencia cuando hay daños en el ADN (Child *et al.*, 2006), como los que generan el cisplatino y la doxorubicina. La línea celular C33 presentó la DL 50 más alta de las tres líneas

para el caso del cisplatino. Lo anterior sugiere que las células cervicales que sufren una transformación maligna independiente de la infección con VPH son más resistentes a este quimiofármaco. Esto mismo ocurrió cuando se determinó la DL 50 del paclitaxel, en donde la línea celular C33 presentó la dosis más alta. No hubo diferencias significativas entre las dosis de HeLa y SiHa, lo que sugiere que el tipo de VPH presente no modifica la susceptibilidad al paclitaxel.

Para el caso del tamoxifén, se sabe que su principal mecanismo de acción es la unión a los receptores de estrógenos para evitar que los estrógenos se unan a éstos, lo que induce muerte por autofagia en las células (Inoki *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha encontrado otro mecanismo de acción que es independiente de la presencia de los receptores de estrógenos y que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que culmina en muerte por apoptosis (Lee *et al.*, 2000). Esto último podría ser lo que ocurre en las células de carcinoma cervical que estudiamos aquí, ya que la línea HeLa carece de receptores de estrógenos (Maminta *et al.*, 1991) mientras que SiHa y C33 sí los presentan (Ruutu *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2001), y sin embargo, las DL 50 para las tres líneas fueron muy semejantes (Tabla 1). Además, se ha reportado que cuando el tamoxifén induce autofagia, las dosis empleadas son mucho menores que cuando induce apoptosis (Lee *et al.*, 2000). Por ejemplo, en la línea celular derivada de carcinoma de mama, MCF-7, positiva para receptores de estrógenos y en la cuál se ha encontrado el tamoxifén induce autofagia, la DL 50 es de sólo 0.107  $\mu\text{M}$  (Guthrie *et al.*, 1997), mientras que para las células de carcinoma cervical nuestras dosis fueron superiores a 20  $\mu\text{M}$ .

En general, se considera a la línea SiHa como multiresistente, es decir, resistente a varios fármacos entre los que se encuentra la doxorubicina (Ding *et al.*, 2000), por lo que no sorprende que esta línea haya presentado la DL 50 más alta para este fármaco.

Nuestros ensayos de prevención de muerte mostraron que la adición de rhEpo protege a células derivadas de carcinoma cervical contra la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén pero parece no tener efecto sobre la muerte inducida por doxorubicina.

El cisplatino es el fármaco base en la quimioterapia del cáncer cervical y nuestros resultados indican que el pretratamiento de células HeLa, SiHa y C33 con rhEpo (a partir de 7.5 U/ml) puede disminuir la muerte provocada por este quimiofármaco (Figura 5). En un estudio previo, Belenkov *et al.*, (2004) demostraron que el tratamiento con 30 U/ml de rhEpo inducía un decremento de la sensibilidad de la línea celular HT100, derivada de cáncer cervical, al cisplatino. De la misma manera, Acs *et al.*, (2003) demostraron que conforme aumentaban la cantidad de rhEpo (desde 0 hasta 200 U/ml) previa al tratamiento con cisplatino por 48 horas en células HeLa, el porcentaje de células apoptóticas disminuía. Es importante hacer notar que en los trabajos mencionados se estudió el efecto de la rhEpo únicamente *in vitro*, y en nuestro caso decidimos investigar tal efecto *in vivo* (Figura 9). La aplicación simultánea de concentraciones farmacológicas de rhEpo y cisplatino en ratones con tumores, indujo una inhibición significativa del efecto del cisplatino en las masas tumorales. Estos datos apoyan fuertemente lo observado *in vitro*, y representan una evidencia experimental que alerta del riesgo



de utilizar este esquema mixto para el tratamiento de anemia y cáncer cervical en los seres humanos.

Hasta el momento, el nuestro, es el primer trabajo en donde se estudiaron los efectos de la rhEpo sobre la muerte inducida por doxorubicina, paclitaxel y tamoxifén en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, esto debido quizás a que toda la atención se ha puesto en el cisplatino, pues es el quimiofármaco más utilizado para tratar los tumores cervicales. Sin embargo, el efecto de la rhEpo sobre la muerte mediada por la doxorubicina, el paclitaxel y el tamoxifén ha sido estudiado en células derivadas de otros carcinomas y en células no tumorales (ver continuación). Por ejemplo, nuestros resultados contrastan con lo encontrado en miocitos cardiacos murinos, en donde a partir de 1 U/ml de rhEpo se observa un efecto protector sobre la muerte que induce la doxorubicina (Kim *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2007). Lo anterior podría deberse, a que la muerte de cardiomiocitos luego del tratamiento con doxorubicina, se debe a la producción de ERO y al aumento en la concentración de calcio intracelular (Kim *et al.*, 2006), mientras que estos mecanismos no son los principales inductores de la actividad antitumoral de éste quimiofármaco (Bruynzeel *et al.*, 2007), si no la intercalación en el ADN y la inhibición de enzimas como la topoisomerasa II. Por su parte, se ha encontrado que la Epo protege a las células cardiacas de los efectos de los radicales libres y del estrés oxidativo (Li *et al.*, 2006). Por lo tanto, podemos sugerir que la rhEpo protege de la muerte por ERO, pero no de la muerte por otros de los mecanismos inducidos por la doxorubicina, lo que da como resultado la protección encontrada en los miocitos y la falta de esta protección en las células tumorales estudiadas aquí. El hecho de que en las líneas celulares derivadas de

cáncer cervical, la doxorubicina fue el único quimiofármaco de los estudiados sobre el cual la rhEpo no tuvo efecto, nos llevó a realizar este estudio en un modelo murino (Figura 9). Interesantemente, se observó que los tumores de los animales que recibieron rhEpo junto con la doxorubicina presentaron una reducción de volumen menor que los que recibieron doxorubicina únicamente. Podríamos sugerir que la rhEpo podría tener efectos protectores parciales sobre la muerte inducida por la doxorubicina *in vivo* aun cuando *in vitro* no se encontró este efecto.

Lo encontrado por nosotros para el caso del paclitaxel (Figura 6) coincide con lo encontrado por Hardee *et al.*, (2006) quienes observaron una disminución en el número de células apoptóticas de cáncer de mama cuando pre-trataban con 10 y 100 U/ml de rhEpo. Sin embargo, este grupo llevó a cabo también el estudio en un modelo murino y en este caso no encontraron efecto con 2000 U/Kg de rhEpo administrada tres veces por semana sobre la disminución del volumen de las masas tumorales (Hardee *et al.*, 2006). Por otro lado, lo encontrado por nosotros contrasta con lo observado por Gewirtz *et al.*, (2006), quienes probaron el pre-tratamiento con 10 U/ml de rhEpo por 24 horas y no encontraron efecto significativo sobre la muerte inducida por paclitaxel en células de cáncer de mama. Resulta un evento relevante las diferencias encontradas entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, por lo que se debe resaltar la importancia de que debemos ser cautelosos cuando deseamos extrapolar lo encontrado *in vitro* a lo que podría ocurrir en seres humanos.

Gewirtz *et al.*, (2006) tampoco encontraron efecto protector significativo de 10 U/ml de rhEpo sobre la muerte inducida por tamoxifén en células de cáncer de mama,

lo que contrasta con lo encontrado por nosotros en donde, desde 7.5 U/ml de rhEpo, se observaron efectos preventivos en la línea celular SiHa (Figura 7B). Los efectos preventivos de la rhEpo sobre el tamoxifén podrían deberse a que ésta, protege de la muerte inducida por generación de ERO (Li *et al.*, 2006) y además, puede activar la vía PI3K/AKT (Spivak 2005), que una vez activa, inhibe la autofagia (Kondo *et al.*, 2005), es decir, la Epo es capaz de inhibir los dos procesos que se han reportado ejercen actividad antitumoral luego de administrar tamoxifén.

En base a lo mencionado anteriormente, podemos sugerir que los efectos de la rhEpo sobre la muerte inducida por distintos quimiofármacos varía según el tipo celular estudiado, por lo que antes de concluir si la rhEpo influye o no en la respuesta al tratamiento con distintos quimiofármacos, se debe evaluar el tipo de tumor y las diferencias que pudieran existir entre estos. Como ejemplo, se podría evaluar la presencia o ausencia del EPO-R y la cantidad de dicha molécula en los diferentes tipos celulares o tumores. Otro hecho que podría influir es la etapa en la que se utilizan los cultivos a la hora de realizar los experimentos y como esto podría afectar la presencia de dicho receptor. No existen reportes que analicen la cantidad de receptores presentes en diferentes condiciones de cultivo o según el número de pasajes del cultivo utilizado, por lo que mediante el uso de citometría de flujo, sería interesante estudiar si en ciertas etapas del cultivo o bajo ciertas condiciones de suero, tipo de medio, entre otras, la cantidad de moléculas de EPO-R varía. Así mismo, sería muy interesante estudiar que sucede con otros quimiofármacos que se emplean como terapia, ya que como encontramos aquí, la rhEpo no afecta de igual manera la muerte inducida por todos los quimiofármacos.

Nuestros experimentos de inhibición del EPO-R con lovastatina demostraron que los efectos protectores de la rhEpo sobre la muerte por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén dependen de la unión de la rhEpo a su receptor (Figura 10).

En este trabajo se observó que la inhibición de JAK 2, que es la molécula inicial de la cascada de señalización mediada por el EPO-R (Lacombe *et al.*, 1999), produce el total abatimiento del efecto preventivo de la rhEpo sobre la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén (Figura 11), lo que sugiere que JAK 2 es necesaria para que se den los efectos preventivos de la rhEpo en células de carcinoma cervical. Esta observación coincide con un trabajo anterior donde se observó que el efecto protector de la rhEpo sobre la muerte de células HeLa inducida por cisplatino disminuía al inhibir JAK 2 con genisteína, la cuál es un inhibidor general de cinasas (Acs *et al.*, 2003). La presencia de JAK 2 en la señalización mediada por rhEpo y su receptor ha sido reportada también en células derivadas de carcinoma pulmonar por Dunlop *et al.*, (2006) mediante el uso de la técnica de Western-blot y en células derivadas de leucemia mielomonocítica y de carcinoma renal por Carvalho *et al.*, (2005) también con el uso del Western-blot utilizando anticuerpos contra JAK 2.

Se ha reportado que los quimiofármacos utilizados en este trabajo inducen apoptosis en distintos tipos celulares (ver a continuación), por lo que se decidió evaluar si la rhEpo era capaz de ejercer efectos protectores sobre este tipo de muerte en células derivadas de carcinoma cervical, como HeLa, que se utilizó debido a que en los estudios anteriores, las tres líneas celulares se comportaron de manera semejante. Para esto se utilizó el ensayo de TUNEL, que detecta células apoptóticas principalmente, aunque también necróticas (Perry *et al.*, 1997).

Los resultados de la prueba del TUNEL (Figura 12) mostraron que los cuatro quimiofármacos inducían estos tipos de muerte en las células HeLa. Lo encontrado aquí para el cisplatino coincide con lo reportado, ya que se sabe que este fármaco induce apoptosis y necrosis en gran cantidad de células, incluidas células de carcinomas de diferentes órganos y células de tejidos sanos (Eastman 1999; Rosenberg 1999; Gonzalez *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). Por otro lado, al paclitaxel se le conoce por ser un estabilizador de microtúbulos y por inducir catástrofe mitótica, la cuál se sabe puede concluir en apoptosis (Castedo *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2005). Nuestros resultados también coinciden con lo reportado para el tamoxifén, que si bien puede inducir autofagia (Bursch *et al.*, 1996), también se ha reportado que induce apoptosis en células derivadas de leucemia de Jurkat, cáncer de ovario (Ferlini *et al.*, 1999), cáncer de mama (Mandlekar *et al.*, 2000) y hepatocarcinoma (Kim *et al.*, 1999). Por último, tal y como se observó aquí, la doxorubicina ha sido reportada como una inductora de apoptosis en células de diverso origen, tanto tumoral, como en tejido sano (Skladanowski *et al.*, 1993; Zaleskis *et al.*, 1994). Interesantemente, en el ensayo de TUNEL se observó que el número de células muertas inducidas por cisplatino, paclitaxel y tamoxifén disminuía cuando las células eran pre-tratadas con rhEpo, lo que sugiere que la rhEpo previene la muerte por apoptosis (y necrosis) de las células.

El proceso de muerte por apoptosis involucra la activación de una gran cantidad de moléculas dentro de las cuáles se encuentran las enzimas conocidas como caspasas (Thornberry *et al.*, 1998). Existen dos grupos de caspasas: las

iniciadoras (caspasa 2, 8, 9, 10) y las efectoras (caspasa 3, 6, 7). La caspasa 3 se activa comúnmente en la muerte celular por apoptosis pero se sabe que la eritropoyetina induce la inhibición de esta caspasa activando la vía PI3K/AKT (Spivak 2005). Debido a lo anterior, se evaluó la presencia de la caspasa 3 activa luego del tratamiento con los quimiofármacos y que efectos tenía la rhEpo sobre ésta.

Resulta interesante que en nuestro trabajo, en base al ensayo de TUNEL, tanto el paclitaxel como el tamoxifén pueden inducir apoptosis, pero en ningún caso se observó un aumento de la caspasa 3 activa (Figura 13). Lo encontrado para el paclitaxel concuerda con lo reportado en células derivadas de cáncer de ovario (Ahn *et al.*, 2004), de cáncer de mama (Ofir *et al.*, 2002) y de leucemia linfoblástica (Park *et al.*, 2004) en donde el tratamiento con paclitaxel tampoco activó a la caspasa 3. Lo anterior contrasta con lo encontrado en células derivadas de melanoma (Selimovic *et al.*, 2008), sarcoma osteogénico (Lu *et al.*, 2005) y de carcinoma de hígado (Brenes *et al.*, 2007) en donde esta caspasa sí se activa. Al parecer, la activación de caspasa 3 por paclitaxel es dependiente del tipo celular. Lo encontrado aquí para el caso del tamoxifén contrasta con lo encontrado en células de cáncer de mama (Mandlekar *et al.*, 2000) y de glioblastoma (Zartman *et al.*, 2004) en donde se observó la activación de la caspasa 3. El pre-tratamiento con rhEpo no modificó el nivel de caspasa 3 activa presente luego de los tratamientos con paclitaxel o tamoxifén.

Aunque la DL 50 obtenida para células HeLa (utilizadas en los ensayos de activación de caspasa 3) tratadas con cisplatino fue de 11.6  $\mu\text{M}$ , y a pesar de que

dicha dosis ha sido reportada como inductora de necrosis (Gonzalez *et al.*, 2001), los tratamientos con cisplatino y doxorubicina incrementaron hasta tres veces la presencia de caspasa 3, elemento exclusivo de la muerte apoptótica. La activación de esta caspasa inducida por el tratamiento con cisplatino ha sido observada también en células derivadas de cáncer de ovario (Henkels *et al.*, 1999), de carcinoma de mama, células renales (Cummings *et al.*, 2002) y muchos otros tipos celulares, en los cuáles, las DL 50 tampoco fueron menores a 8  $\mu$ M, lo que Gonzalez *et al.*, reportaron como límite para que el cisplatino provocara muerte apoptótica. Por su parte, se ha observado que la doxorubicina activa a la caspasa 3 en células endoteliales humanas, células derivadas de cáncer de ovario humano (Bruynzeel *et al.*, 2007), células derivadas de neuroblastoma humano (Bian *et al.*, 2001) y cardiomiocitos de ratón (Fu *et al.*, 2007).

Sorprendentemente, el pre-tratamiento con rhEpo no inhibió significativamente la caspasa 3, lo que contrasta con lo encontrado por Fu *et al.*, (2007) en miocitos cardíacos murinos que habían sido tratados con doxorubicina en los cuales se demostró mediante un ensayo colorimétrico que el pre-tratamiento con 100 U/ml de rhEpo reducía significativamente la cantidad de caspasa 3 activa.

Debido a lo anterior, podríamos sugerir que la rhEpo no tiene efecto sobre la activación de la caspasa 3, por lo que su efecto protector podría deberse a la inhibición de otros componentes implicados en las vías de señalización de la muerte celular por estos quimiofármacos. Por ejemplo, la rhEpo podrían actuar sobre otras caspasas o bien, podría inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas como ocurre en líneas celulares derivadas de progenitores eritroides

(Silva *et al.*, 1999), en células endoteliales (Okazaki *et al.*, 2008) y más interesante aún, en células de glioblastoma multiforme (Yin *et al.*, 2007) y células de cáncer de mama (Acs *et al.*, 2004), en las que la Epo induce que se exprese Bcl-XL.

En un trabajo reciente Hardee *et al.*, (2006) sugirieron que las células de cáncer de mama que sobrevivían a la muerte por paclitaxel gracias al pre-tratamiento con rhEpo podrían estar senescentes. La senescencia celular que se presenta luego de los tratamientos con algunos quimiofármacos o la radiación  $\gamma$ , es un proceso rápido llamado también senescencia celular prematura o acelerada que se desencadena por el daño al ADN que se produce luego de la quimioterapia o la radioterapia (Chang *et al.*, 1999). En un inicio se le consideró un mecanismo que servía de defensa contra estímulos carcinogénicos y como un mecanismo de supresión tumoral en el cual la célula dañada detiene su ciclo celular por lo que no se reproduce, evitando que las células dañadas formen masas tumorales. Sin embargo, hoy se sabe que aunque las células senescentes no se reproducen, sí poseen la capacidad de inducir el crecimiento y reproducción de células cercanas a ellas lo que puede originar crecimientos tumorales por un mecanismo aún desconocido (Campisi 2005; Martien *et al.*, 2007; Pazolli *et al.*, 2008), pero que al parecer implica la modificación del microambiente y cambios en la matriz extracelular (Sprenger *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se evaluó la presencia de células senescentes luego del tratamiento con los diferentes quimiofármacos y rhEpo. Los resultados fueron muy interesantes, primero, porque es un campo muy poco estudiado actualmente y segundo, porque los datos encontrados son muy particulares para cada caso



(Figura 14). La primera observación fue que el porcentaje de células senescentes en el grupo control (células HeLa sin tratamiento alguno) fue del 33%, lo que es elevado en comparación con otros cultivos celulares. Lo anterior se puede deber a que las células HeLa presentan un nivel de expresión constitutivo y elevado de p16INK4a (Goodwin *et al.*, 2001), proteína que participa en la inducción de senescencia.

Sorprendentemente, se encontró que la rhEpo aumentaba el número de células senescentes en el cultivo de células HeLa. Este es un hallazgo muy importante ya que la terapia con rhEpo podría favorecer la senescencia de células tumorales. Esta senescencia podría deberse a la activación de p21, ya que en un estudio realizado en células de eritroleucemia se encontró que la Epo activa a ésta proteína (Torti *et al.*, 1992) y como se mencionó en la introducción de ésta tesis, p21 participa en la inducción de la senescencia. Así mismo, la activación de STAT 5 se asocia con la inducción de senescencia (Malette *et al.*, 2007), y como se ha venido mencionando, la Epo induce la activación de la vía JAK/STAT, en la que participan en este caso, JAK 2 y STAT 5 justamente.

Luego, para el cisplatino se encontró que el número de células senescentes no aumentaba en proporción al número basal de las células sin tratamiento, lo que contrasta con lo encontrado en células de carcinoma de pulmón (Fang *et al.*, 2007) donde se ha encontrado que el cisplatino induce senescencia. Sin embargo, no podemos decir que esta senescencia ocurre de manera natural, pues las células utilizadas en el estudio realizado por Fang *et al.* en 2007 son resistentes al cisplatino, y la senescencia se presentó luego de que transfectaron a las células con p16INK4a (proteína que como se mencionó anteriormente, está implicada en

el proceso de senescencia) para volverlas sensibles al quimiofármaco. Además, se encontró que conforme aumentaban la cantidad de p16INK4a que transfectaban, aumentaba el número de células senescentes, por lo que la senescencia inducida por el cisplatino parece ser dependiente de la cantidad de p16INK4a presente en las células. Se podrían transfectar células HeLa y ver si entonces el cisplatino induce senescencia también, ya que como se mencionó anteriormente, la senescencia es considerada un tipo de muerte celular en el contexto de la terapia antitumoral. En nuestro estudio, el pre-tratamiento con rhEpo no tuvo ningún efecto ya que el número de células senescentes se mantuvo igual a que cuando las células solo recibieron tratamiento con rhEpo.

En el caso del paclitaxel, se observó que el número de células senescentes no aumentaba, lo cual concuerda con lo visto por Klein *et al.*, (2005) en células de carcinoma pulmonar, en donde el paclitaxel tampoco produjo células senescentes. Sin embargo, de sumo interés resulta que cuando se pre-trató con rhEpo y luego se dio el tratamiento con paclitaxel, el número de células senescentes fue incluso menor que en el grupo de células que no recibió tratamiento alguno, lo que parece indicar que el paclitaxel suprime la senescencia basal y la inducida por la rhEpo. Para confirmar esta hipótesis, se requerirían más estudios sobre el mecanismo de acción del paclitaxel para encontrar si hay relación con éste y p16INK4a.

Este es el primer trabajo que evaluó el efecto del tamoxifén sobre el número de células senescentes y se encontró que en células HeLa este fármaco incrementó al doble el número de células senescentes. En el caso de este quimiofármaco, cuando se utilizó en conjunto con la rhEpo, el número de células senescentes regreso al nivel basal. Quizá este es uno de los casos y combinaciones más

interesantes encontrados en este estudio, por lo que se debería estudiar más qué ocurre en otros tipos celulares cuando se combinan tamoxifén y rhEpo en cuanto a inducción de senescencia se refiere y cuál podría ser el mecanismo implicado.

Por último, se sabe que la doxorubicina induce senescencia en gran cantidad de tipos celulares, como derivadas de cáncer de mama (Elmore *et al.*, 2005), cáncer de pulmón (Klein *et al.*, 2005), sarcoma sinovial (Joyner *et al.*, 2006), sarcoma de Ewing (Lanvers-Kaminsky *et al.*, 2005), hepatoma humano (Eom *et al.*, 2005) y cardiomiocitos (Maejima *et al.*, 2008). Nosotros encontramos que, efectivamente, en las células HeLa también aumentó la senescencia. Se ha encontrado que la activación de p21 es necesaria para que la doxorubicina induzca senescencia (Rebbaa *et al.*, 2003), por lo que sería interesante ver si esto mismo ocurre en las células HeLa en las que se observó la senescencia. Al igual que como ocurrió con el tamoxifén, el pre-tratamiento con rhEpo hizo que el número de células senescentes disminuyera, incluso el número de éstas células fue menor que en el grupo control sin tratamiento alguno. Este hecho es muy interesante pues es la primera vez que se reporta el efecto supresor de la rhEpo sobre la senescencia inducida por doxorubicina. Además, debido a que tanto la doxorubicina como la rhEpo indujeron senescencia, y a que ambos casos podrían deberse a la activación de p21, era de esperarse que el número de células senescentes incrementara, o se quedara igual. Por ejemplo, Gewirtz *et al.*, (2006) reportaron que en células derivadas de cáncer de mama el tratamiento con 10 U/ml de rhEpo antes de exponerlas a la doxorubicina, no tuvieron efecto sobre el número de células senescentes. Las diferencias entre estos dos estudios puede deberse en primer lugar a que nosotros evaluamos el efecto de 250 U/ml de rhEpo y en un

segundo término, a que las células son de diferente origen. Parece ser que la combinación de rhEpo con doxorubicina inhibe la senescencia en células HeLa. Son necesarios más experimentos para poder determinar el mecanismo de acción que induce este fenómeno.

Por último, debido a que se ha reportado que la rhEpo puede inducir resistencia a la radiación en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical (Belenkov *et al.*, 2004), en nuestro trabajo se evaluó por primera vez si la rhEpo podría inducir resistencia a los quimiofármacos estudiados aquí (Figura 15).

Aún cuando se sabe que el cisplatino genera resistencia en diversos tipos de células como por ejemplo, células derivadas de carcinomas de ovario, pulmón y páncreas (Wang *et al.*, 2005), esto no se observó en las células HeLa. Así mismo, la rhEpo no indujo resistencia a este quimiofármaco.

En cambio, las células que sobrevivieron al tratamiento con rhEpo y paclitaxel, se volvieron más resistentes al quimiofármaco.

Es bien sabido que uno de los problemas del uso del tamoxifén es su rápida inducción de resistencia por mecanismos como el decremento de la entrada del fármaco en la célula, el aumento de la expulsión del fármaco mediado por la bomba membranal glicoproteína P y la activación de la vía PI3K/AKT (Ring *et al.*, 2004). En nuestro estudio se observó justamente que las células que habían sobrevivido al primer tratamiento con tamoxifén y recibieron una segunda dosis, resultaron más resistentes. El pre-tratamiento con rhEpo no ocasionó que dicha resistencia aumentara.

Al igual que como ocurrió con el paclitaxel, las células que sobrevivieron al tratamiento con rhEpo y doxorubicina fueron las más resistentes a la segunda

dosis del quimiofármaco, lo que sugiere que la rhEpo indujo que las células fueran más resistentes.

Se sabe que la expresión de algunas isoformas de la proteína cinasa C (PKC) induce resistencia a quimiofármacos (Spitaler *et al.*, 1999; Hofmann 2001; Serova *et al.*, 2006). Interesantemente, la eritropoyetina es capaz de inducir la expresión de PKC (Ren *et al.*, 1994; Tsushima *et al.*, 1997), por lo que ésta podría ser la explicación de lo encontrado para el tratamiento con rhEpo y paclitaxel. De hecho, se ha reportado que en células de carcinoma de colon (Cesaro *et al.*, 2001) la expresión de PKC confiere resistencia a éste quimiofármaco. Así mismo, la expresión de la PKC mediada por el pre-tratamiento con rhEpo podría explicar la resistencia a la segunda dosis de doxorubicina, ya que se ha reportado que la PKC induce resistencia a dicho quimiofármaco en células de mieloma múltiple (Baumann *et al.*, 2008), carcinoma de ovario (Brügger *et al.*, 2002) y carcinoma de mama (Yu *et al.*, 1991).

Por último, cabe mencionar que la resistencia que confiere la rhEpo al segundo tratamiento con doxorubicina *in vitro*, podría explicar lo observado en el experimento *in vivo*, en donde los tumores de los ratones que recibieron 10 dosis de rhEpo y 5 dosis de doxorubicina disminuyeron menos su volumen en comparación con los que solo recibieron la doxorubicina. Esta observación plantea la necesidad de realizar nuevas pruebas *in vitro* en las que se administren varias dosis de los quimiofármacos para evaluar si los efectos de la rhEpo observados con una sola dosis de quimiofármacos se mantienen.

## VIII. PERSPECTIVAS

A partir de estudios realizados en ratones, se ha reportado que en el tejido cardíaco y en la espina dorsal, la protección que induce la rhEpo es mediada por la unión de ésta a un heteroreceptor. Este heteroreceptor está formado, por una subunidad del EPO-R y la subunidad  $\beta$  (también llamada CD131) de los receptores para IL-3, IL-5 y GM-CSF (Brines *et al.*, 2004). En biopsias de tumores de cáncer cervical se encontró que la expresión del EPO-R es dependiente de condiciones de hipoxia (asociada al desarrollo de clonas más agresivas y resistentes a la radio y quimioterapia) y que además, su expresión aumenta conforme aumentan las etapas de este cáncer (Acs *et al.*, 2004). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la presencia de CD131. Sería interesante evaluar la presencia de CD131 en biopsias de tumores cervicales ya que se sabe que CD131 se expresa en células de leucemia mieloide (Koubek *et al.*, 1998) y si CD131 estuviera presente en tumores cervicales, este podría formar heterodímeros con el EPO-R. Para detectar a CD131 se podría utilizar la técnica de inmunohistoquímica o mediante RT-PCR. Posteriormente, utilizando la técnica de inmunoprecipitación, se podría detectar si en los tumores se forma el heterodímero. De existir el heterodímero, se podría plantear la posibilidad de bloquear a CD131 para que la rhEpo solo actuara sobre los progenitores eritroides y no sobre los tumores, ya que se ha encontrado que, CD131 no tiene un papel funcional en la hematopoyesis, además, en los progenitores eritroides no interviene en la señalización mediada por EPO (Scott *et al.*, 2000).

Para los quimiofármacos utilizados se ha reportado que además de la caspasa 3, se activan otras, como las caspasas 6, 8 (Seki *et al.*, 2000) y 9 (Wu *et al.*, 2004) por el cisplatino, las caspasas 2 (Ho *et al.*, 2008), 4 (Liao *et al.*, 2004), 7 (Kottke *et al.*, 2001), 8 (Blagosklonny *et al.*, 2002), 9 (Selimovic *et al.*, 2008) y 10 (Park *et al.*, 2004) por el paclitaxel, las caspasas 7 (Thiantanawat *et al.*, 2003) y 9 (Obrero *et al.*, 2002) por el tamoxifén y las caspasas 6 (MacLachlan *et al.*, 2002) 8 y 9 (Bian *et al.*, 2001) por la doxorubicina. Un siguiente objetivo podría ser evaluar la presencia de dichas caspasas en células HeLa luego del tratamiento con los cuatro quimiofármacos y analizar si la rhEpo induce la disminución de la presencia de éstas. Para lo anterior, se podrían utilizar kits colorimétricos como el utilizado en este trabajo o bien, anticuerpos en contra de las caspasas de interés para ser evaluadas mediante Western blot.

Debido a que la Epo puede activar la vía PI3K/AKT (Spivak 2005), y que la activación de dicha vía inhibe la autofagia (Kondo *et al.*, 2005), sería interesante estudiar si la rhEpo activa esta vía en células tumorales ya que la autofagia es para algunos quimiofármacos como el tamoxifén (Bursch *et al.*, 1996) y la temozolomida (Kanzawa *et al.*, 2004) un mecanismo importante de actividad antitumoral.

Por otro lado, sería interesante también estudiar al factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que puede inducir tanto la muerte como la supervivencia celular dependiendo de diversos factores que aun no se comprenden bien, pero que podrían implicar tipo celular, duración y origen del estímulo entre otros (Dutta *et al.*, 2006). Este factor es mejor conocido por sus funciones anti-apoptóticas pero también se ha

encontrado que en ciertos casos es necesario para la inducción de apoptosis (Dutta *et al.*, 2006). Se ha encontrado que este factor se puede activar luego del tratamiento con cisplatino (Dutta *et al.*, 2006) y doxorubicina (Bian *et al.*, 2001, Bien *et al.*, 2004, Gruber *et al.*, 2008). En el caso de la doxorubicina, esta activación parece ser necesaria para la inducción de la muerte celular (Bian *et al.*, 2001; Bien *et al.*, 2004). En cambio, en el caso del cisplatino, este factor inhibe la muerte y genera resistencia celular en la mayoría de los casos (Huerta *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Poma *et al.*, 2006), por ejemplo, en células SiHa (células derivadas de carcinoma cervical) (Lu *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2002; Venkatraman *et al.*, 2005). Interesantemente, la eritropoyetina es capaz de activar dicho factor en células progenitoras eritroides (Sae-Ung *et al.*, 2005; Bittorf *et al.*, 2001) así como de inducir su inhibición en células de leucemia mielomonocítica (Carvalho *et al.*, 2005), por lo que en este caso, sería interesante estudiar su presencia en las células derivadas de carcinoma cervical luego de los tratamientos con cisplatino y doxorubicina y los pre-tratamientos con rhEpo. Para lo anterior se podría utilizar el ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), ya que el estado y nivel de expresión del NF- $\kappa$ B podría determinar por qué la rhEpo protege de la muerte del cisplatino pero no de la inducida por doxorubicina. Con ayuda de los ensayos EMSA y de anticuerpos contra sub-unidades que forman el NF- $\kappa$ B se podría además estudiar que subunidades se activan en cada caso, ya que este factor se puede formar con diferentes homodimeros o heterodimeros (Dutta *et al.*, 2006).



Con respecto a la inducción de resistencia a los quimiofármacos mediada por la rhEpo, existe un reporte de inducción de resistencia al cisplatino mediada por la expresión de PKC inducida por rhEpo en células de carcinoma renal (Li *et al.*, 2007), sin embargo, en las células HeLa, la rhEpo no provocó resistencia al cisplatino, por lo que los efectos de la rhEpo sobre la expresión de la PKC y de ésta sobre la resistencia a determinados quimiofármacos parece ser dependiente del tipo celular, además, según los reportado por diversos estudios, podría también depender de la isoforma de PKC que se expresa, ya que se ha encontrado, que la PKC- $\alpha$  induce resistencia al cisplatino en células de carcinoma de ovario (Righetti *et al.*, 2006) y en células HeLa (Spitaler *et al.*, 1999), en cambio, las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  se asocian con el aumento en la sensibilidad al cisplatino y la muerte apoptotica inducida por daños al ADN en fibroblastos (Basu 2003, Spitaler *et al.*, 1999). Los estudios acerca de la inducción de resistencia mediada por rhEpo, podrían ser un campo muy interesante según lo encontrado aquí y considerando que la resistencia es un gran problema que limita mucho el uso de ciertos quimiofármacos. Para estudiar que ocurre con la PKC en las células HeLa, se podrían llevar acabo RT-PCRs para confirmar la expresión de PKC así como la isoforma implicada antes y luego de los tratamientos con rhEpo y los quimiofármacos. Spitaler *et al.*, (1999) encontraron que las células HeLa expresan PKC- $\alpha$  y PKC- $\delta$  lo que les confiere resistencia al cisplatino, sin embargo, esto contradice lo encontrado por Basu (2003) quien encontró que la expresión de PKC- $\delta$  se asocia con un incremento en la apoptosis y con lo encontrado por nosotros, que no encontramos resistencia al cisplatino en células las células HeLa.

Por último, en base a lo encontrado en este trabajo, se propone planear nuevos esquemas de tratamiento cuando se desea emplear eritropoyetina en paralelo con quimiofármacos para así, no comprometer a las pacientes.

## **IX. CONCLUSIONES**

- La eritropoyetina recombinante humana ejerce efectos preventivos sobre la muerte inducida por los quimiofármacos cisplatino, paclitaxel y tamoxifén en células derivadas de carcinoma cervical pero no ejerce este efecto sobre la muerte inducida por doxorubicina.
- Los efectos protectores de la eritropoyetina en células de carcinoma cervical dependen del receptor de eritropoyetina y de la consecuente activación de JAK 2.
- La eritropoyetina no tiene efecto sobre la activación de la caspasa 3 que se da por el cisplatino y la doxorubicina.
- El efecto protector de la eritropoyetina sobre la muerte inducida por cisplatino se observa también *in vivo*.
- La eritropoyetina tampoco ejerce efectos protectores sobre la muerte inducida por doxorubicina *in vivo*.
- La eritropoyetina puede inducir senescencia celular en cultivos.
- La eritropoyetina induce resistencia al paclitaxel y a la doxorubicina en cultivos de células de carcinoma cervical.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

**-Abraham RT.** 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes and Development.* 15, 2177-2196.

**-Acs G, Acs P, Beckwith SM.** 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Research.* 61, 3561-3565.

**-Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ.** 2004. Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters.* 214, 243-451.

**-Acs G, Xu X, Chu C, Acs P, Verma A.** 2004. Prognostic significance of erythropoietin expresión in human endometrial carcinoma. *Cancer.* 100, 2376-2386.

**-Acs G, Zhang PJ, McGrath CM.** 2003. Hypoxia inducible erythropoietin signalling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potencial role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *American Journal of Pathology.* 162, 1789-1806.

**-Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, Han SM, Shin JW, Yang HO.** 2004. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 91, 1043-1052.

**-Alonso P, Lazcano E, Hernández M.** 2005. Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control. Editorial panamericana. 2ª. edición. México.

**-Arcasoy MO, Amin K, Chou SC.** 2005. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clinical Cancer Research.* 11, 20-27.

**-Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF.** 2002. Functional significance of erythropoietin receptor expresión in breast cancer. *Laboratory Investigation.* 82, 911-918.

**-Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA.** 2003. Expression of erythropoietin receptor sílice variants in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 307, 999-1007.

**-Bahr BA, Bendiske J.** 2002. The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *Journal of Neurochemistry.* 83, 481-489.

**-Basu A.** 2003. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 7, 341-350.

- Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P.** 2003. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Laboratory Investigation*. 83, 1477-1487.
- Baumann P, Armann J, Mandl-Weber S, Grün G, Oduncu F, Schmidmaier R.** 2008. Inhibitors of protein kinase C sensitise multiple myeloma cells to common genotoxic drugs. *European Journal of Haematology*. 80, 37-45.
- Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E.** 2004. Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3, 1525-1532.
- Bellacosa A.** 2001. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death and Differentiation*. 8, 1076-1092.
- Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, Porter AG, Castle VP, Opirari AW.** 2001. NF- $\kappa$ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 48921-48929.
- Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A.** 2003. Cathepsin D Triggers Bax Activation, Resulting in Selective Apoptosis-inducing Factor (AIF) Relocation in T Lymphocytes Entering the Early Commitment Phase to Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 31401-31411.
- Bien S, Ritter CA, Gratz M, Sperker B, Sonnemann J, Beck JF, Kroemer HK.** 2004. Nuclear Factor- $\kappa$ B mediates up-regulation of cathepsin B by Doxorubicin in tumor cells. *Molecular Pharmacology*. 65, 1092-1102.
- Bittorf T, Büchse T, Sasse T, Jaster R, Brock J.** 2001. Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by the erythropoietin receptor. Structural requirements and biological significance. *Cellular Signalling*. 13, 673-681.
- Blagosklonny MV, Fojo T.** 1999. Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (a critical review). *International Journal of Cancer*. 83, 151-156.
- Blagosklonny MV, Robey R, Saeed Sheikh M, Fojo T.** 2002. Paclitaxel-induced FasL-independent apoptosis and slow (non-apoptotic) cell death. *Cancer Biology and Therapy*. 2, 113-117.
- Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W, Paus R.** 2007. Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB Journal*. 21, 3346-3354.

- Bohlius J, Weingart O, Trelle S, Engert A.** 2006. Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin –an updated review. *Nature Clinical Practice Oncology.* 3, 152-164.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV.** 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology.* 55, 244-265.
- Brenes O, Arce F, Gätjens-Boniche O, Diaz C.** 2007. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. *Biomedical Pharmacotherapy.* 61, 347-355.
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie Q, Smart J, Su-Rick C, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A.** 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common  $\beta$ -subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101, 14907-14912.
- Bröker LE, Huisman C, Span SW, Rodríguez JA, Kruyt A, Giaccone G.** 2004. Cathepsin B Mediates Caspase-Independent Cell Death Induced by Microtubule Stabilizing Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research.* 64, 27-30.
- Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G.** 2005. Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research.* 11, 3155-3162.
- Brüger D, Brischwein K, Liu C, Bader P, Niethammer D, Gekeler V, Beck JF.** 2002. Induction of drug resistance and protein kinase C genes in A2780 ovarian cancer cells after incubation with antineoplastic agents at sublethal concentrations. *Anticancer Research.* 22, 4229-4232.
- Bruick RK, McKnight SL.** 2002. Oxygen sensing gets a second wind. *Science.* 295, 807-808.
- Bruynzeel AME, Abou El Hassan MA, Torun E, Bast A, Van der Vijgh WJF, Kruyt FAE.** 2007. Caspase-dependent and -independent suppression of apoptosis by monoHER in Doxorubicin treated cells. *British Journal of Cancer.* 96, 450-456.
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS.** 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis.* 17, 1595-1607.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J.** 2003. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia reperfusion injury and promotes beneficial

remodeling. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 100, 4802-4806.

**-Campisi J.** 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120, 513-522.

**-Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C.** 2005. Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF- $\kappa$ B rescue pathway. *Oncogene*. 24, 737-745.

**-Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G.** 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 23, 2825-2837.

**-Cemazar M, Golzio M, Escoffre JM, Couderc B, Sersa G, Teissié J.** 2006. In vivo imaging of tumor growth after electrochemotherapy with cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 348, 997-1002.

**-Cesaro P, Raiteri E, Démoz M, Castino R, Baccino FM, Bonelli G, Isidoro C.** 2001. Expression of protein kinase C beta 1 confers resistance to TNF $\alpha$  and paclitaxel-induced apoptosis in HT-29 colon carcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 93, 179-184.

**-Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** 1999. 14-3-3 $\sigma$  is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*. 401, 616-620.

**-Charrois GJR, Allen TM.** 2003. Multiple Injections of Pegylated Liposomal Doxorubicin: Pharmacokinetics and Therapeutic Activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306, 1058-1067.

**-Chen DZ, Qi M, Auburn KJ, Carter TH.** 2001. Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium. *Journal of Nutrition*. 131, 3294-3302.

**-Child ES, Mann DJ.** 2006. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle*. 12, 1313-1319.

**-Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR.** 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation*. 13, 1396-1402.

**-Choi MK, Song IS.** 2008. Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 23, 243-253.

- Cory S, Adams JM.** 2002. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer.* 2, 647-656.
- Cohen GM.** 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemistry Journal.* 326, 1–16.
- Cummings BS, Schnellmann RG.** 2002. Cisplatin-induced renal cells apoptosis: Caspase 3-dependent and –independent pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 302, 8-17.
- Dalmark M, Storm H.** 1981. A Fickian diffusion transport process with features of transport catalysis. *Journal of General Physiology.* 78, 349-364.
- D' Andrea AD, Zon LI.** 1990. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *Journal of Clinical Investigation.* 86, 681-687.
- Danial NN, Korsmeyer SJ.** 2004. Cell death: critical control points. *Cell.* 116, 205-219.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri K, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G.** 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* 14, 729-739.
- De Bree E, Theodoropoulos PA, Rosing H, Michalakis J, Romanos J, Beijnen JH, Tsiftsis DD.** 2006. Treatment of ovarian cancer using intraperitoneal chemotherapy with taxanes: From laboratory bench to bedside. *Cancer Treatment Reviews.* 32, 471-482.
- Decorti G, Klugmann FB, Candussio L, Furlani A, Scarcia V, Baldini L.** 1989. Uptake of adriamycin by rat and mouse mast cells and correlation with histamine release. *Cancer Research.* 49, 1921-1926.
- Ding HF, McGill G, Rowan S, Schmaltz C, Shimamura A, Fisher DE.** 1998. Oncogene-dependent regulation of caspase activation by p53 protein in a cell-free system. *Journal of Biological Chemistry.* 273, 28378-28383.
- Ding Z, Yang X, Chernenko G, Tang SH, Pater A.** 2000. Human papillomavirus type 16-immortalized endocervical cells selected for resistance to cisplatin are malignantly transformed and have a multidrug resistance phenotype. *International Journal of Cancer.* 87, 818-823.
- Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E.** 1985. The role of the carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology.* 116, 2293-2299.



**-Du C, Fang M, Li Y.** 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102, 33-42.

**-Dunlop EA, Percy MJ, Boland MP, Maxwell AP, Lappin TR.** 2006. Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. *Neurodegenerative Diseases*. 3, 94-100.

**-Dutta J, Fan J, Gupta N, Fan G, Gélinas C.** 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- $\kappa$ B. *Oncogene*. 25, 6800-6816.

**-Eccles TG, Patel A, Verma A.** 2003. Erythropoietin and the erythropoietin receptor are expressed by papillary thyroid carcinoma from children and adolescents. Expression of erythropoietin receptor might be a favorable prognostic indicator. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 33, 411-422.

**-Eastman A.** 1999. The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis. En el libro: *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*, Bernhard Lippert, Ed. Wiley. EEUU. 111-134.

**-El-Deiry WS.** 2003. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*. 22, 7486-7495.

**-Elmore LW, Di X, Dumur C, Holt SE, Gewirtz DA.** 2005. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. *Clinical Cancer Research*. 11, 2637-2643.

**-Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS.** 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*. 24, 4765-4777.

**-Fang K, Chiu CC, Li CH, Chang YT, Hwang HT.** 2007. Cisplatin-induced senescence and growth inhibition in human non-small cell lung cancer cells with ectopic transfer of p16INK4a. *Oncology Research*. 16, 479-488.

**-Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA.** 1992. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*. 79, 1987-1994.

**-Ferlini C, Scambia G, Marone M, Distefano M, Gaggini C, Ferrandina G, Fattorossi A, Isola G, Benedetti Panici P, Mancuso S.** 1999. Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. 79, 257-263.

**-Ferrandina G, Distefano M, Smaniotto D, Morganti A, Paglia A, Macchia G, Corvari B, Lorusso D, Scambia G.** 2006. Anemia in patients with locally advanced cervical carcinoma administered preoperative radiochemotherapy:

Association with pathological response to treatment and clinical outcome. *Gynecologic Oncology*. 103, 500-505.

**-Fu P, Arcasoy MO.** 2007. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354, 372-378.

**-Funaoka K, Shindoh M, Yamashita T, Fujinaga K, Amemiya A, Totsuka Y.** 1996. High-risk HPV-positive human cancer lines show different sensitivity to cisplatin-induced apoptosis correlated with the p21<sup>Waf1/Cip1</sup> level. *Cancer Letters*. 108, 15-23.

**-Furuta T.** 2002. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Research*. 62, 4899-4902.

**-Gao X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV.** 1995. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Research*. 55, 1002-1005.

**-Gao ZN, Wei YQ, Yang PS, Xu X, Zhao HQ, Huan X, Kang B.** 2007. Combined effects of soluble vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 gene therapy and cisplatin chemotherapy in human tongue carcinoma xenografts. *Oral Oncology*. 43, 477-483.

**-Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** 1992. Identification of Programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 119, 493-501.

**-Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A.** 1989. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 32, 2344-2352.

**-Gewirtz DA, Di X, Walker TD, Sawyer ST.** 2006. Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. *Clinical Cancer Research*. 12, 2232-2238.

**-Glaser CM.** 2001. Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*. 50, 705-715.

**-Gonczy P.** 2002. Nuclear envelope: torn apart at mitosis. *Current Biology*. 12, 242-244.

**-Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM.** 2001. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis ?. *Molecular Pharmacology*. 59, 657-663.

**-Goodnough LT.** 2005. Risks of blood transfusion. *Anesthesiology clinics of North America.* 23, 241-252.

**-Goodwin EC, DiMaio D.** 2001. Induced Senescence in HeLa Cervical Carcinoma Cells Containing Elevated Telomerase Activity and Extended Telomeres. *Cell Growth and Differentiation.* 12, 525–534.

**-Groopman JE, Itri LM.** 1999. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *Journal of the National Cancer Institute.* 91, 1616-1634.

**-Gruber BM, Anuszewska EL, Bubko I, Kasprzycka-Guttman T, Misiewicz I, Skupińska K, Fokt I, Piebe W.** 2008. NFkappaB activation and drug sensitivity in human neoplastic cells treated with anthracyclines. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* 65, 267-271.

**-Guthrie N, Gapor A, Chambers AF, Carroll KK.** 1997. Inhibition of Proliferation of Estrogen Receptor-Negative MDA-MB-435 and -Positive MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Palm Oil Tocotrienols and Tamoxifen, Alone and in Combination. *The Journal of Nutrition.* 127, 544-548.

**-Hait WN, Jin S y Yang JM.** 2006. A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clinical Cancer Research.* 12, 1961-1965.

**-Hamadmad SN, Henry MK, Hohl RJ.** 2006. Erythropoietin receptor signal transduction requires protein geranylgeranylation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 316, 1941-1949.

**-Hamadmad SN, Hohl RJ.** 2007. Lovastatin suppresses erythropoietin receptor surface expression through dual inhibition of glycosylation and geranylgeranylation. *Biochemical Pharmacology.* 74, 590-600.

**-Han KQ, Huang G, Gu W, Su YH, Huang XQ, Ling CQ.** 2007. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *World Journal of Gastroenterology.* 24, 3374-3379.

**-Hardee ME, Rabbani ZN, Arcasoy MO, Kirkpatrick JP, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Blackwell KL.** 2006. Erythropoietin inhibits apoptosis in breast cancer cells via an Akt-dependent pathway without modulating *in vivo* chemosensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics.* 5, 355-361.

**-Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y.** 2003. Apoptosis –the p53 network. *Journal of Cell Science.* 116, 4077-4085.

**-Hayflick L, Moorhead PS.** 1961. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research.* 25, 585-621.

- Henke M, Mattern D, Pepe M, Bézay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F.** 2006. Do Erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings ?. *Journal of Clinical Oncology*. 29, 4708-4713.
- Henkels KM, Turchi JJ.** 1999. Cisplatin-induced Apoptosis Proceeds by Caspase-3-dependent and -independent Pathways in Cisplatin-resistant and -sensitive Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. 59, 3077-3083.
- Hermeking H.** 1997. 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell*. 1, 3-11.
- Ho LH, Read SH, Dorstyn L, Lambrusco L, Kumar S.** 2008. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene*. 27, 3393-3404.
- Hofmann J.** 2001. Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 142, 1-96.
- Hortobagui GN.** 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs*. 54 (supl 4) 1-7.
- Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yeppez S, Lin J, Chen D, Bonavida B, Livingston EH.** 2007. Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. *Journal of Surgical Research*. 142, 184-194.
- Huynh H, Chee Soo K, Chow P, Panasci L, Tran E.** 2006. Xenografts of Human Hepatocellular Carcinoma: A useful model for testing drugs. *Clinical Cancer Research*. 14, 4306-4314.
- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL.** 2005. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature Genetics*. 37, 19-24.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL.** 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 115, 577-590.
- Jäättelä M.** 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression, *Oncogene*, 23, 2746-2756.
- Jamieson ER, Lippard SJ.** 1999. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews*. 99, 2467-2498.
- Jelkmann W.** 1992. Erythropoietin: structure, control of production and function. *Physiological Reviews*. 72, 449-489.

**-Jelkmann W.** 2004. Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine*. 43, 649-659.

**-Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L.** 1996. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*. 56, 816-825.

**-Joyner DE, Bastar JD, Randall RL.** 2006. Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *Journal of Orthopaedic Research*. 24, 1163-1169.

**-Kalimo H, Savontaus ML, Lang H, Paljarvi L, Sonninen V, Dean PB, Katevuo K, Salminen A.** 1988. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. *Annals of Neurology*. 23, 258-265.

**-Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S.** 2004. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*. 11, 448-457.

**-Karantza-Wadsworth V, White E.** 2007. Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*. 6, 610-613.

**-Karsenti E, Vernos I.** 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 294, 543-547.

**-Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A.** 1993. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: A mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood*. 82, 2340.

**-Kim JA, Kang YS, Jung MW, Lee SH, Lee YS.** 1999. Involvement of Ca<sup>2+</sup> influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Letters*. 147, 115-123.

**-Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, Kim UH.** 2006. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental and Molecular Medicine*. 38, 535-545.

**-Kim J, Klionsky DJ.** 2000. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual Reviews of Biochemistry*. 69, 303-342.

**-Kim SS, Lee KH, Sung DK, Shim JW, Kim MJ, Jeon GW, Chang YS, Park WS.** 2008. Erythropoietin attenuates brain injury, subventricular zone expansion, and sensorimotor deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats. *Journal of Korean Medical Science*. 23, 484-491.

- Kim KH, Oudit GY, Backx PH.** 2007. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 324, 160-169.
- Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T.** 1998. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science.* 282, 487-490.
- Klein LE, Freeze BS, Smith AB, Horwitz SB.** 2005. The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle.* 4, 501-507.
- Klionsky, DJ.** 2003. *Autophagy.* Landes Bioscience. Georgetown, Texas, EEUU. 307 pp.
- Klionsky DJ, Ohsumi Y.** 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 15, 1-32.
- Knight K.** 2004. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *American Journal of Medicine.* 116, Suppl. 7A, S11-S26.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S.** 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews.* 5, 726-734.
- Koubek K, Kumberová A, Starý J, Babusíková O, Klamová H, Filippec M.** 1998. Expression of cytokine receptors on different myeloid leukemic cells. *Neoplasma.* 45, 397-399.
- Koury MJ, Bondurant MC.** 1990. Erythropoietin retards DNA break-down and prevents programmed cell death in erythroid cells. *Science.* 248, 378-384.
- Kroemer G, Jaattela M.** 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews in Cancer.* 5, 886-897.
- Kroemer G, Martin SJ.** 2005. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine.* 11, 725-730.
- Kumar SM, Acs G, Fang D.** 2005. Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. *American Journal of Pathology.* 166, 823-830.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE.** 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene.* 17, 3247-3259.
- Lacombe C, Mayeux P.** 1999. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 14, Supl. 2, 22-28.
- LaMontagne KR, Butler J, Marshall DJ, Tullai J, Gechtman Z, Hall C, Meshaw A, Farrell FX.** 2006. Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in

erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. *Molecular Cancer Therapy*. 5, 347-355.

**-Lanvers-Kaminsky C, Winter B, Koling S, Frodermann B, Braun Y, Schaefer KL, Diallo R, Koenemann S, Wai D, Willich N, Poremba C, Schuck A.** 2005. Doxorubicin modulates telomerase activity in Ewing's sarcoma in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 14, 751-758.

**-Lavey RS, Liu PY, Greer BE, Robinson WR, Chang PC, Wynn RB, Conrad ME, Jiang C, Markman M, Alberts DS.** 2004. Recombinant human erythropoietin as an adjunct to radiation therapy and cisplatin for stage IIB-IVA carcinoma of the cervix: a Southwest Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 95, 145-151.

**-Lee YS, Kang YS, Lee SH, Kim JA.** 2000. Role of NAD(P)H oxidase in the tamoxifen-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cell Death and Differentiation*. 10, 925-932.

**-Lee TK, Poon RT, Wo JY, Ma S, Guan XY, Myers JN, Altevogt P, Yuen AP.** 2007. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Research*. 67, 8800-8809.

**-Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Höckel M.** 2006. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clinical Cancer Research*. 23, 6894-6900.

**-Leu JI, Dumont P, Haferty M.** 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biology*. 6, 443-450.

**-Levine B, Klionsky DJ.** 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*. 6, 463-477.

**-Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E.** 2005. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: A survival study. *Journal of Clinical Oncology*. 23, 5960-5972.

**-Li H, Zhu H, Xu CJ.** 1998. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94, 491-501.

**-Li J, Vesey DA, Johnson DW, Gobe G.** 2007. Erythropoietin reduces cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells via a PKC dependent pathway. *Cancer Biological Therapy*. 6, 1944-1950.

- **Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH.** 2005. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Research.* 65, 6934-6942.
- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.** 2006. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovascular Research.* 71, 684-694.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M.** 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 402, 672-676.
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH.** 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2 interacting protein. *Journal of Virology.* 72, 8586-8596.
- Liao PC, Tan SK, Lieu CH, Jung HK.** 2008. Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry.* 104, 1509-1523.
- **Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C.** 2003. The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 278, 27593-27604.
- Lin FK, Suggs S, Lin CH.** 1985. Cloning and expresión of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 82, 7580-7584.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86, 147-157.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104, 487-501.
- López MA, López E.** 2008. Dosis altas de eritropoyetina  $\beta$ semanal en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en remisión, que reciben quimioterapia; efecto en sus requerimientos transfusionales. *Medicina Interna Mexicana.* 24, 375-380.
- Lu KH, Lue KH, Chou MC, Chung JG.** 2005. Paclitaxel induces apoptosis via caspase-3 activation in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). *Journal of Orthopaedic Research.* 23, 988-994.



- Lu YS, Yeh PY, Chuang SE, Gao M, Kuo ML, Cheng AL.** 2006. Glucocorticoids enhance cytotoxicity of cisplatin via suppression of NF-kappa B activation in the glucocorticoid receptor-rich human cervical carcinoma cell line SiHa. *Journal of Endocrinology.* 188, 311-319.
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB.** 2005. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 6, 439-448.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H.** 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94, 481-490.
- Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M.** 2008. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell.* 7, 125-136.
- MacLachlan TK, El-Deiry WS.** 2002. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 99, 9492-9497.
- Malette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G.** 2007. The DNA signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes and Development.* 21, 43-48.
- Maluf FC, Spriggs D.** 2002. Anthracyclines in the treatment of gynecologic malignancies. *Gynecologic Oncology.* 85, 18-31.
- Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N.** 2004. eIF4E-from translation to transformation. *Oncogene.* 23, 3172-3179.
- Maminta ML, Molteni A, Rosen ST.** 1991. Stable expression of the human estrogen receptor in HeLa cells by infection: effect of estrogen on cell proliferation and c-myc expression. *Molecular and cellular endocrinology.* 78, 61-69.
- Mandlekar S, Hebbar V, Christov K, Kong ANT.** 2000. Pharmacodynamics of Tamoxifen and Its 4-Hydroxy and N-Desmethyl Metabolites: Activation of Caspases and Induction of Apoptosis in Rat Mammary Tumors and in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Research.* 60, 6601-6606.
- Mandlekar S, Yu R, Tan T, Kong ANT.** 2000. Activation of caspase-3 and c-jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer research.* 60, 5995-6000.
- Martien S, Abbadie C.** 2007. Acquisition of oxidative DNA damage during senescence: the first step toward carcinogenesis?. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1119, 51-63.

- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG.** 1997. Sites of erythropoietin production. *Kidney international.* 51, 393-401.
- Meriweather VD, Bachur NR.** 1972. Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and Adriamycin in L1210 mouse leukemia. *Cancer Research.* 32, 1137-1142.
- Meyuhas O.** 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry.* 267, 6321-6330.
- Mihara M, Erster S, Zaika A.** 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell.* 11, 577-590.
- Minchinton AI, Tannock IF.** 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer.* 6, 583-592.
- Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R.** 1989. Oestrogen Stimulates Differential Transcription of Human Papillomavirus Type 16 in SiHa Cervical Carcinoma Cells. *Journal of General Virology.* 70, 2227-2232.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E.** 1977. Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry.* 252, 5558-5564.
- Moliterno AR, Spivak JL.** 1996. Anemia of cancer. *Hematology Oncology Clinics of North America.* 10, 345-363.
- Mukhopadhyay P, Bátkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Haskó G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P.** 2007. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of the American Collage of Cardiology.* 50, 528-536.
- Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England journal of medicine.* 348, 518-527.
- Nagata S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88, 355-365.
- Nicholson DW, Thornberry NA.** 2003. Life and death decisions. *Science.* 299, 214-215.
- Nigg EA.** 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 17, 471-480.
- Obrero M, Yu DV, Shapiro DJ.** 2002. Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for Tamoxifen and 4 hydroxytamoxifen-induced programmed cell death. *The Journal of Biological Chemistry.* 277, 45695–45703.

- Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Krup M, Yavelsky V, Weinstein Y, Wolfson M.** 2002. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death and Differentiation*. 9, 636-642.
- Okada H, Mak TW.** 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews Cancer*. 4, 592-603.
- Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Niu K, Arai H.** 2008. Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis. *Neoplasia*. 10, 932-939.
- Pajonk F, Weil A, Sommer A, Suwinski R, Henke M.** 2004. The erythropoietin-receptor pathway modulates survival of cancer cells. *Oncogene*. 23, 8987-8991.
- Papanicolau GN, Traut HF.** 1941. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 42(2), 193-206.
- Park SJ, Wu CH, Gordon JD, Zhong X, Emami A, Safa AR.** 2004. Taxol induces caspase-10 dependent apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 51057-51067.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J.** 1999. Estimates of the World-wide incidence of 25 major cancers in 1990. *International Journal of Cancer*. 80, 827-841.
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J.** 2003. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *The Journal of Clinical Investigation*. 112, 999-1007.
- Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S.** 2004. Pretreatment with Epo reduces the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion injury in the mouse kidney in vivo. *Kidney International*. 66, 983-989.
- Pazolli E, Stewart SA.** 2008. Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Current opinions in Genetic Development*. 18, 42-47.
- Perry SW, Epstein LG, Gelbard HA.** 1997. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Biotechniques*. 22, 1102-1106.
- Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG.** 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 280, 6447-6454.
- Poma P, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Sanguedolce R, Alaimo A, Carina V, Maurici A, Cusimano A, Cervello M, D'Alessandro N.** 2006. Antitumor effects of

the novel NF-kappaB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production. *International Journal of Oncology*. 28, 923-930.

**-Pommier Y, Sordet O, Anthony S, Hayward RL, Kohn KW.** 2004. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*. 23, 2934-2949.

**-Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM.** 2008. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Research and Treatment*.

**-Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL.** 2003. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*. 22, 2805-2811.

**-Remy I, Wilson IA, Michnick SW.** 1999. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. 283, 990-993.

**-Ren HY, Komatsu N, Shimizu R, Okada, Miura K.** 1994. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C gamma1 in a human erythropoietin-dependent cell line. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 19633-19638.

**-Ricci SM, Zong WX.** 2006. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The Oncologist*. 11, 342-357.

**-Righetti SC, Perego P, Carenini N, Coma E, Dal Bo L, Cedrola S, La Porta CA, Zunino F.** 2006. Molecular alterations of cells resistant to platinum drugs: role of PKC alpha. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763, 93-100.

**-Ring A, Dowsett M.** 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrinology Related to Cancer*. 11, 643-658.

**-Robins HI, Won M, Seiferheld WF, Schultz CJ, Choucair AK, Brachman DG, Demas WF, Mehta MP.** 2006. Phase 2 trial of radiation plus high-dose tamoxifen for glioblastoma multiforme: RTOG protocol BR-0021. *Neuro-Oncology*. 8, 47-52.

**-Robles SJ, Adami GR.** 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 16, 1113-1123.

**-Roninson IB, Broude EV, Chang BD.** 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*. 4, 303-313.

- Rosenberg B.** 1999. Platinum complexes for the treatment of cancer. Why the research goes on. En el libro: Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Bernhard Lippert, Ed. Wiley. EEUU. 3-27.
- Rossert J, Eckardt KU.** 2005. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 20, 1025-1028.
- Ruutu M, Wahlroos N, Syrjänen K, Johansson B, Syrjänen S.** 2006. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. *International Journal of Gynecological Cancer*. 16, 1261-1268.
- Sae-Ung N, Matsushima T, Choi I, Abe Y, Winichagoon P, Fucharoen S, Nawata H, Muta K.** 2005. Role of NF-kappa B in regulation of apoptosis of erythroid progenitor cells. *European Journal of Haematology*. 74, 315-323.
- Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T.** 2003. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*. 424, 223-228.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S.** 1998. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95, 4635-4640.
- Saintigny P, Besse B, Callard P, Vergnaud AC, Czernichow S, Colombat M, Girard P, Validire P, Breau JL, Bernaudin JF, Soria JC.** 2007. Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 16, 4825-4831.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M.** 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 109, 335-346.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT.** 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science*. 300, 135-139.
- Scott CL, Robb L, Papaevangeliou B, Mansfield R, Nicola NA, Begley CG.** 2000. Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood*. 96, 1588-1590.
- Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM.** 2005. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Current Medicinal Chemistry. Anticancer Agents*. 5, 251-265.

- Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N, Tasaka K.** 2000. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 45, 199-206.
- Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, Hengee UR.** 2008. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cellular Signalling.* 20, 311-322.
- Serova M, Ghoul A, Benhadji KA, Cvitkovic E, Faivre S, Calvo F, Lokiec F, Raymond E.** 2006. Preclinical and clinical development of novel agents that target the protein C family. *Seminars of Oncology.* 33, 466-478.
- Shaul Y.** 2000. c-ABL: activation and nuclear targets. *Cell Death and Differentiation.* 7, 10-16.
- Shinozawa S, Oda T.** 1981. Determination of adriamycin (doxorubicin) and related fluorescent compounds in rat lymph and gall by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 212, 323-330.
- Shintani T, Klionsky DJ.** 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 306, 990-995.
- Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL.** 1999. Erythropoietin can induce the expression of Bcl-XL through Stat 5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *The Journal of Biological Chemistry.* 32, 22165-22169.
- Sinani D, Adle DJ, Kim H, Lee J.** 2007. Distinct Mechanisms for Ctr1-mediated Copper and Cisplatin Transport. *The Journal of Biological Chemistry.* 282, 26775–26785.
- Skladanowski A, Konopa J.** 1993. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochemical Pharmacology.* 46, 375-382.
- Smogorzewska A, de Lange T.** 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO Journal.* 21, 4338-4348.
- Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG.** 1995. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *Journal of Biological Chemistry.* 270, 10909-10914.
- Spitaler M, Wiesenhofer B, Biedermann V, Seppi T, Zimmermann J, Grunicke H, Hofmann J.** 1999. The involvement of protein kinase C isoenzymes alpha, epsilon and zeta in the sensitivity to antitumor treatment and apoptosis induction. *Anticancer Research.* 19, 3969-3976.

**-Spivak JL.** 2005. The anemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nature Reviews Cancer*. 5, 543-555.

**-Spivak JL, Pham TH, Isaacs MA, Hankins WD.** 1991. Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor. *Blood*. 77, 1228.

**-Sprenger CC, Drivdahl RH, Woodke LB, Eyman D, Reed MJ, Carter WG, Plymate SR.** 2008. Senescence-induced alterations of laminin chain expression modulate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Neoplasia*. 12, 1350-1361.

**-Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V.** 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 19, 2109-2117.

**-Stewart CF, Ratain MJ.** 1997. Topoisomerase interactive agents. En el libro *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. EEUU. 3504 pp.

**-Stüben G, Thews O, Pöttgen C, Knühmann K, Vaupel P, Stuschke M.** 2001. Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 127, 346-350.

**-Stüben G, Thews O, Pöttgen C, Knühmann K, Sack H, Stuschke M, Vaupel P.** 2003. Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie*. 179, 620-625.

**-Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N.** 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 103, 645-654.

**-Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H.** 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell*. 8, 613-621.

**-Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y.** 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*. 119, 301-311.

**-Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L, Kohl NE, Sepp-Lorenzino L, Lobell RB.** 2005. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesis KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell*. 8, 609-614.

**-Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee YC, Abulafia O.** 2006. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is

associated with poor response to radiation. *International Journal of Gynecological Cancer*. 16, 1855-1861.

**-TePoele RH, Okorokov AL, Jardine L.** 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer research*. 62, 1876-1883.

**-Thiantanawat A, Long BL, Brodie AM.** 2003. Signaling Pathways of Apoptosis Activated by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens. *Cancer Research*. 63, 8037-8050.

**-Thornberry NA, Lazebnik Y.** 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281, 1312-1316.

**-Torroella M, Villa S.** 1998. Bases genéticas del cáncer. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. 112 pp

**-Torti M, Marti KB, Altschuler D, Yamamoto K, Lapetina EG.** 1992. Erythropoietin induces p21ras activation and p120GAP tyrosine phosphorylation in human erythroleukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*. 267, 8293-8298.

**-Tsirpanlis G.** 2007. Cellular senescence, cardiovascular risk, and CKD: A review of established and hypothetical interconnections. *American Journal of Kidney Diseases*. 51, 131-144.

**-Tsushima H, Urata Y, Miyazaki Y, Fuchigami K, Kuriyama K, Kondo T, Tomonaga M.** 1997. Human Erythropoietin receptor increases GATA-2 and Bcl-XL by a protein kinase C-dependent pathway in human erythropoietin-dependent cell line AS-E2. *Cell Growth and Differentiation*. 8, 1317-1328.

**-Vandenabeele P, Orrenius S, Zhivotovsky B.** 2005. Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death and Differentiation*. 12, 1219-1224.

**-VanLoo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P.** 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation*. 8, 1136-1142.

**-VanRaalte J, Rice C, Moss CE.** 1990. Visible-light system for detecting doxorubicin contamination on skin and surfaces. *American Journal of Hospital Pharmacy*. 47, 1067-1074.

**-Veldman R, Koning G, Van Hell A, Zerp S, Vink SR, Storm G, Verheij M, Van Blitterswijk W.** 2005. Coformulated N-Octanoyl-glucosylceramide Improves Cellular Delivery and Cytotoxicity of Liposomal Doxorubicin. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 315, 704-710.



- Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunakaran D.** 2005. Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*. 44, 51-59.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M.** 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102, 43-53.
- Wang D, Lippard SJ.** 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews*. 4, 307-320.
- Weaver BA, Cleveland DW.** 2005. Decoding the links between mitosis, cancer and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*. 8, 7-12.
- Westenfelder C, Baranowski RL.** 2000. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney International*. 58, 647-657.
- Westphal G, Niederberger E, Blum C.** 2002. Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality. *Tumori*. 88, 150-159.
- Willis SN, Chen L, Dewson G.** 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes and Development*. 19, 1294-1305.
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O.** 1993. JAK 2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 74, 227-236.
- Wright WE, Shay JW.** 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Medicine*. 6, 849-851.
- Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA.** 2005. The chemoprotective agent N-Acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 312, 424-431.
- Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A.** 1988. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science*. 242, 933-935.
- Yang CW, Li C, Jung JY.** 2003. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *The Journal of The Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17, 1754-1755.

**-Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S.** 2002. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis*. 23, 1797-1805.

**-Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T.** 2003. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis*. 24, 1021-1029.

**-Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R.** 1998. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 25381-25387.

**-Yasuda Y, Musha T, Tanaka H.** 2001. Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *British journal of Cancer*. 84, 836-843.

**-Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL.** 2002. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochemical Pharmacology*. 63,1423-1430.

**-Yi X, Bekeredjian R, DeFilippis NJ, Siddiquee Z, Fernandez E, Shoheit RV.** 2005. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 290, 1098-1102.

**-Yin D, Kawabata H, Tcherniamtchouk O, Huynh T, Black KL, Koeffler HP.** 2007. Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. *International Journal of Oncology*. 31, 1193-1198.

**-Yoshimura A, D' Andrea AD, Lodish HF.** 1990. Friend soleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87, 4139-4143.

**-Yoshimura A, Misawa H.** 1998. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Current Opinion in Hematology*. 5, 171-176.

**-Yu G, Ahman S, Aquino A, Fairchild CR, Trepel JB, Ohno S, Suzuki K, Tsuruo T, Cowan KH, Glazer RI.** 1991. Transfection with protein kinase C alpha confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein. *Cancer Community*. 3, 181-189.

**-Zaleskis G, Berleth E, Verstovek S, Ehrke MJ, Mihich E.** 1994. Doxorubicin-induced DNA degradation in murine thymocytes. *Molecular Pharmacology*. 46, 901-908.

**-Zartman JK, Foreman NK, Donson AM, Fleitz JM.** 2004. Measurement of tamoxifen-induced apoptosis in glioblastoma by cytometric bead analysis of active caspase-3. *Journal of Neurooncology.* 67, 3-7.

## **XI. APÉNDICE**

### **Buffer de Lisis**

Tris HCl 0.05 M pH = 8

Glicerol 10%

SDS 2%

$\beta$ -mercaptoetanol 5%

### **Eritropoyetina de Sigma-Aldrich**

Se agregaron 100  $\mu$ l de agua destilada estéril a 4 °C al vial. Una vez disuelto el contenido, se tomaron 5  $\mu$ l y se cuantificó la cantidad de proteína. Después, se calculó la cantidad de eritropoyetina en unidades (U) en base a que en 1 mg de proteína hay 100,000 U (información del proveedor Sigma-Aldrich).

### **Lovastatina (Rayere Farmacéuticos)**

Las tabletas de Liperol® se machacaron y luego se disolvieron en hidróxido de sodio 0.1 N a 50 °C por tres horas en agitación constante. La solución se guardó a 4 °C toda la noche protegida de la luz y al día siguiente se decantó el excipiente que quedó en el fondo. El pH se ajustó a 7.4 con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N. Luego de esto, la solución se filtró con membranas de acetato para su esterilización. La solución se almacenó a 4 °C y protegida de la luz. La lovastatina se utilizó a una concentración de 20  $\mu$ M.

### **Solución fijadora**

Formaldehído 20 %

Glutaraldehído 2 %

(Preparado en PBS)

### **Solución de MTT**

El 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) se disolvió en PBS (1 mg/ml, equivalente a 2.4 mM). La solución se filtró para su esterilización y fue almacenada a 4 °C protegida de la luz.

### **Solución de tinción**

Ferricianida de potasio 5 mM

Ferrocianida de potasio 5 mM

MgCl<sub>2</sub> 2 mM

DMSO 10%

(Preparado en PBS)

### **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM

Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 0.1 N y se aforó a un litro. Se esterilizó 20 minutos en autoclave a 15 lb/sq.in. Se mantuvo a 4°C.

### **Inactivación del Suero Fetal Bovino (SFB) GIBCO**

El suero se incubó a una temperatura de 57 °C por 30 minutos durante los cuales, cada 10 minutos, se agitó vigorosamente.

### **Verseno**

EDTA 1mM

NaCl 0.17 M

KCl 3 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se aforó a un litro. Se esterilizó 20 minutos en autoclave a 15 lb/sq.in. Se mantuvo a 4°C.

### **Solución X-Gal**

20 mg X-Gal / ml de DMSO