



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE LA MUERTE CELULAR
INDUCIDA POR DOXORRUBICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER
CERVICOUTERINO”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:
LIBB. IDALIA CLAUDIA ROJAS BARRERA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA LETICIA ROCHA ZVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA (IIB, UNAM)
DR. IVAN VELASCO VELAZQUEZ (IFC, UNAM)**

MÉXICO, D. F. Abril, 2013



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.

Índice de abreviaturas

AREEs	Agentes Recombinantes Estimuladores de la Eritropoyesis
AEC	Anemia de Enfermedades Crónicas
CaCu	Cáncer Cérvicouterino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DL	Dosis Letal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dox	Doxorrubicina
Epo	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de Eritropoyetina
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
Hb	Hemoglobina
HDACs	Desacetilasas de Histonas
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HSIL	Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado
I κ B α	Inhibidor del Factor de Nuclear-kappa B
JAK	Cinasa Janus
LSIL	Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado
MAP	Mitogen-Activated Protein
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF- κ B	Factor Nuclear-kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Radioterapia
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Cáncer cervicouterino	3
2.2 Historia natural de la enfermedad	3
2.3 Tratamiento del cáncer cérvicouterino	4
2.3.1 Esquemas de quimioterapia alternos para el tratamiento de cáncer cervicouterino recurrente y/o metastásico	5
2.3.2 Compuestos derivados de platino	6
2.3.3 Antraciclinas	7
2.3.4 Antimetabolitos	7
2.3.5 Otros antineoplásicos	8
2.4 Efectos secundarios de la quimioterapia	8
2.5 Anemia	9
2.5.1 Anemia en pacientes con cáncer cervicouterino	9
2.5.2 Tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer	11
2.5.3 Administración de la Epo a pacientes con cáncer	12
2.6 Papel de la Epo y su receptor en el tratamiento del cáncer cérvicouterino	13
2.6.1 Señalización de la eritropoyetina y su receptor	15
2.6.2 Eritropoyetina y NF- κ B	17
2.7 Vía de señalización clásica de NF- κ B	17
3. Antecedentes	19
4. Justificación	19
5. Hipótesis	20
6. Objetivo general	20
6.1 Objetivos particulares	20
7. Materiales y métodos	21
7.1 Material biológico y reactivos	21
7.2 Cultivo celular	21
7.3 Ensayo de MTT	21
7.4 Ensayos para determinar el efecto de Epo sobre la muerte inducida por Dox	22

7.5 Extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares	22
7.6 Western Blot	23
7.7 Ensayo de inhibición de JAK2 con tirfostina AG490	23
7.8 Ensayo de unión de NF- κ B a su elemento de respuesta	24
7.9 Análisis estadístico	24
8. Resultados	25
8.1 La Epo incrementa la citotoxicidad de la Dox	25
8.2 El tratamiento con Epo y/o Dox promueven la disminución de p65 en citoplasma	26
8.3 La Epo promueve la disminución de p65 en el citoplasma	27
8.4 La inhibición de JAK2 revierte la disminución de p65 en el citoplasma y el incremento en la toxicidad de la Dox inducido por Epo	28
8.5 La combinación de Epo y Dox incrementa la unión de NF- κ B a su secuencia blanco	30
9. Discusión	32
10. Conclusiones	38
11. Apéndice	39
12. Referencias	43

Of. No. PMDCB/816/2012

LIBB. CLAUDIA IDALIA ROJAS BARRERA
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 17 de Septiembre del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada “Efecto de la eritropoyetina sobre la muerte celular inducida por doxorubicina en células de cáncer cervicouterino”, dirigida por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Jesús Adolfo García Sainz
VOCAL	Dr. Emilio Rojas del Castillo
VOCAL	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
VOCAL	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO	Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de Septiembre de 2012.
EL COORDINADOR DE ENTIDAD


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS*lgg

Reconocimientos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, en el laboratorio 212 del edificio C del Instituto del Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto CB-2010-01 Clave 152492 y del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT con los proyectos IN216810 e IN209613.

Durante el desarrollo de este trabajo, la sustentante gozó de la beca número 376788 otorgada por CONACyT.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Dr. Salomón Hernández Gutiérrez de la Universidad Panamericana, por su generosidad al donar las alícuotas de los anticuerpos anti-p65 y anti-p50 utilizados en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por la ayuda técnica brindada para realizar el ensayo de unión de NF- κ B a su secuencia blanco.

A la M. en C. María Cecilia Aguilar Zacarías por la ayuda técnica.

Al comité tutorial integrado por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y el Dr. Iván Velasco Velázquez.

Al jurado integrado por

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dr. Emilio Rojas del Castillo
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosas correcciones.

Agradecimientos

A la Dra. Rocha por las enseñanzas obtenidas durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Alejandro Zentella por su valiosa asesoría teórica y técnica, por ser un excelente docente y persona.

A mis compañeras de laboratorio por la ayuda y paciencia, en especial a Ceci, Helena y Nelly por hacer del laboratorio un lugar más agradable.

A Rodolfo por todo el apoyo, no tengo palabras para agradecer todo lo que haces por mi.

A mis amigos que colaboraron con numerosas donaciones de material, desde el Bradford hasta el luminol, Rodolfo, Favi, Marco y Alfredo.

A mi querida familia por apoyarme siempre en todos mis proyectos.

A mi apéndice familiar Guillermo, Lilian y Sandra.

A las amigos que compartieron esta etapa y la hicieron inolvidable, en especial a Maribel, Sandy, Ale, Mike, Oscar, Lore y Andy.

A los profesores y compañeros que han contribuido a mi formación profesional y personal.

1. Resumen

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es una neoplasia de los epitelios escamoso y cilíndrico del cuello del útero. En México en el año 2008, se presentaron 10 186 casos nuevos de CaCu y 5 061 (49.6 %) decesos (GLOBOCAN, 2008).

Las pacientes con cáncer presentan diferentes síndromes paraneoplásicos, la anemia es el más frecuente de ellos. Al inicio del tratamiento el 37% de las pacientes con CaCu tienen niveles de hemoglobina menores o iguales a 12 g/dL, porcentaje que puede incrementar hasta un 80%. La corrección de la anemia es un aspecto crítico, pues está asociada a un mal pronóstico en la evolución de pacientes. Existen tres estrategias principales para el tratamiento de la anemia: la administración de hierro, las transfusiones sanguíneas y la eritropoyetina humana recombinante (rHuEpo).

La eritropoyetina (Epo) es una glicoproteína que previene la apoptosis, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea. La expresión del receptor para eritropoyetina (EpoR) en diferentes tipos de cáncer se ha vinculado con tumores más agresivos. Algunos reportes indican que la Epo y otros factores de crecimiento hematopoyéticos protegen a las células de CaCu de la muerte celular inducida por quimiofármacos.

En nuestro laboratorio se demostró la expresión del EpoR en líneas celulares de CaCu y que la exposición a rHuEpo tiene diferentes efectos sobre la muerte inducida por quimiofármacos; es capaz de proteger a las células de la muerte inducida por cisplatino, pero incrementa la citotoxicidad de la doxorubicina (Dox). En este trabajo evaluamos el mecanismo por el cual la Epo incrementa la citotoxicidad de la Dox. Se ha reportado que la Epo y la Dox son capaces de activar el factor de transcripción NF- κ B, el cual promueve la muerte celular bajo ciertos estímulos. Nuestros resultados muestran que la Epo y la Dox son capaces de inducir la translocación de NF- κ B al núcleo y cuando ambos estímulos son combinados la activación de NF- κ B se incrementa.

Además, observamos que la Epo promueve la disminución de p65 del citoplasma de manera gradual y sostenida, hasta por dos horas. Se ha descrito que en neuronas la cinasa JAK2, activada por Epo, es capaz de fosforilar al inhibidor de NF- κ B, I κ B α . Basadas en esta observación, decidimos inhibir

farmacológicamente a esta enzima. Nuestros resultados indican que la inhibición de JAK2 reduce el efecto de la Epo sobre la citotoxicidad de Dox y evita la disminución de p65 del citoplasma; lo que sugiere que JAK2 está involucrada en la activación de NF- κ B y en el incremento de citotoxicidad de Dox mediado por Epo.

En conclusión, la Epo es capaz de activar la vía de NF- κ B e incrementar su translocación al núcleo cuando se combina con Dox, lo que sugiere una relación entre el incremento de citotoxicidad y la activación de este factor de transcripción.

2. Introducción

2.1 Cáncer cérvicouterino

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es una neoplasia de células del epitelio escamoso o del epitelio cilíndrico en el cuello del útero. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial, con un promedio de 500 000 nuevos casos anuales y una tasa de mortalidad aproximada del 50%(OMS, 2012). En México en el año 2008, se presentaron 10 186 casos nuevos de CaCu y 5 061 decesos (GLOBOCAN 2008).

El 99.8% de los casos de CaCu están asociados al Virus del Papiloma Humano (VPH). Los VPHs son agentes de transmisión sexual y están clasificados en dos grupos principales: los VPHs de bajo riesgo que sólo producen verrugas; y los VPHs de alto riesgo (VPHs-AR) que están asociados al desarrollo de lesiones precancerosas o cancerosas del cuello uterino. A nivel mundial el VPH-16 y el VPH-18 son responsables del 70% de casos de CaCu (Muñoz *et al.*, 2006). La infección con VPH es un evento frecuente en mujeres, se ha estimado que la prevalencia de la infección a nivel mundial se sitúa entre 2 a 44% (Bosh *et al.*, 2003). Aunque esta cifra varía de acuerdo al método empleado, pues estudios que combinan la detección de DNA viral y anticuerpos contra proteínas de la cápside del VPH, demuestran que más del 50% de la población de mujeres sexualmente activas, han sido infectadas por uno o más tipos de VPHs en algún punto de sus vidas (Baseman, 2005).

2.2 Historia natural de la enfermedad

El cuello del útero está formado por dos tipos de epitelios: el epitelio basal y el epitelio cilíndrico o glandular. Para que ocurra la infección con VPH las partículas virales deben acceder a la capa basal del epitelio estratificado a través de una microlesión, una vez ahí el virus se une a las α -6-integrinas y a heparan sulfato para internalizarse (Evander *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 1999).

En un epitelio sano cuando las células basales se dividen, una célula hija queda en la capa suprabasal, ésta deja de dividirse y entra en un proceso de

diferenciación terminal (Madison, 2003). En cambio, en un epitelio infectado por un VPH-AR, las oncoproteínas virales E6 y E7 promueven que la célula entre de nuevo al ciclo celular y produzca más viriones. E7 se une a la proteína pRb, la cual mantiene secuestrado al factor de transcripción E2F. Cuando E7 se une a pRb desplaza a E2F, lo que lleva a la expresión de genes involucrados en la replicación de DNA (Munger *et al.*, 2001). Por otro lado, la proteína viral E6 se une a p53 e impide la inducción de apoptosis, E6 también puede unirse a otras proteínas proapoptóticas como Bak (Thomas *et al.*, 1998) y Bax (Li *et al.*, 2000). En conjunto estos eventos pueden llevar a la transformación celular.

Para que se produzcan viriones capaces de infectar a otras células, el VPH debe amplificar su genoma y empaquetarlo en partículas virales, esto ocurre en la capa superior del epitelio estratificado. Debido a que el VPH es un virus incapaz de romper las células infectadas sólo es liberado cuando las células epiteliales se descaman. Los VPHs son muy estables, resisten la desecación y congelación, de esta forma pueden ser transmitidos directamente a otros individuos (Baseman *et al.*, 2005).

Tanto los virus genitales oncogénicos como los no oncogénicos, pueden causar lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), mientras que las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) sólo son producidas por los VPHs-AR (Baseman *et al.*, 2005). Los pasos que se conocen para la carcinogénesis cervical incluyen: la infección con un VPH-AR, el desarrollo de una HSIL, la progresión a carcinoma *in situ* y posteriormente a un carcinoma invasor. La literatura sugiere que alrededor de uno o dos tercios de las mujeres con HSIL, desarrollarán un carcinoma invasor si no reciben tratamiento (Petersen, 1956; Kinlen *et al.*, 1978). La edad promedio de las mujeres con CaCu invasivo se sitúa alrededor de los 50 años, mientras que la edad promedio de mujeres con HSIL es de 28 años, lo cual sugiere un estado precanceroso largo (Baseman *et al.*, 2005).

2.3 Tratamiento del cáncer cérvicouterino

El tratamiento del CaCu consiste en diversas estrategias y su aplicación depende de factores como la edad de la paciente, el historial reproductivo, citologías y tratamientos previos (Wright *et al.*, 2007). El tratamiento estándar

incluye a la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT) (Grigsby *et al.*, 2001). Cabe señalar que la respuesta efectiva al tratamiento suele disminuir para tumores en etapas avanzadas.

La cirugía y la RT son efectivas para tumores en etapas tempranas y con un volumen reducido: menor a siete milímetros (Eifel *et al.*, 1991; Grigsby *et al.*, 2001). El tratamiento de pacientes con CaCu en etapas I o IIA consiste en RT o histerectomía radical. Pacientes en etapas más avanzadas como la IB también son candidatas a la histerectomía, y suelen requerir RT adyuvante cuando se llegan a encontrar células tumorales en los márgenes de nódulos linfáticos o invasión estromal profunda; estos tratamientos reportan tasas de sobrevivencia del 83% y una sobrevida libre de recurrencia de 5 años en el 74% de los casos (Landoni *et al.*, 1997; Landoni *et al.*, 2001). Para aquellas pacientes en estadios de CaCu más avanzados o recurrente, se recomienda radiación pélvica externa y QT.

A la fecha, el cisplatino es el quimiofármaco más eficiente en el tratamiento de CaCu (Kim *et al.*, 2012) y se ha reportado que incrementa la sensibilidad de las células tumorales a la RT (Szumiel *et al.*, 1976). Los regímenes de administración de este fármaco son variados, aunque una dosis semanal de 40 mg/m² durante 6 semanas es el estándar (Grigsby *et al.*, 2001).

2.3.1 Esquemas de quimioterapia alternos para el tratamiento de cáncer cervicouterino recurrente y/o metastásico

A pesar de que el cisplatino es el quimiofármaco de primera línea en el tratamiento del CaCu, su eficacia es limitada, pues está ampliamente documentado que algunos tumores presentan resistencia inherente o adquirida a este fármaco (Dempke *et al.*, 2000; Kelland, 2007). Por tal motivo, existen esquemas quimioterapéuticos alternos, cuyo objetivo es mejorar la respuesta a la quimioterapia e incrementar las tasas de sobrevivencia. Estos regímenes alternos incluyen una amplia variedad de fármacos que son combinados en esquemas dobles, triples y hasta cuádruples (Tao *et al.*, 2008). La lista antineoplásicos usados en la clínica es amplia, los más representativos son: la doxorubicina (Dowdy *et al.*, 2002; du Bois *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008;) el 5-fluorouracilo (Eifel *et al.*, 2004), el carboplatino, el paclitaxel (Kitagawa *et al.*,

2012) el oxaliplatino (Kuo *et al.*, 2010), el metotrexato (Dowdy *et al.*, 2002) y la ifosfamida (Tao *et al.*, 2008), entre otros.

Aunque los antineoplásicos empleados en el tratamiento de CaCu poseen diferentes mecanismos de acción, pueden agruparse en familias de acuerdo a su origen y al modo en que inducen la muerte celular.

2.3.2 Compuestos derivados de platino

El primer miembro de esta familia es el cisplatino, su actividad antitumoral fue descubierta por Rosenberg en los sesenta (Rosenberg *et al.*, 1965). A pesar de su eficacia, este antineoplásico presenta desventajas como la presencia de clones resistentes en el tumor (Dempke *et al.*, 2000; Kelland, 2007). Por esta razón han surgido derivados como el carboplatino y el oxaliplatino. El principal mecanismo de acción de los derivados de platino es la formación de aductos en el DNA, lo que lleva a la muerte celular por apoptosis (Kelland, 2007). A pesar de que se acepta que el DNA es el blanco principal del cisplatino, hay evidencia de que otros blancos celulares pueden estar involucrados en la citotoxicidad de este compuesto, que es capaz de unirse a los fosfolípidos de membrana, irrumpir en citoesqueleto y afectar la polimerización de actina (Jamieson *et al.*, 1999).

A diferencia del cisplatino, el carboplatino presenta una menor nefrotoxicidad y atraviesa con mayor facilidad la barrera hematoencefálica (Riccardi *et al.*, 1992; Kelland, 2007); sin embargo, los aductos formados por el carboplatino son menos estables (Micetich *et al.*, 1985) y se ha reportado resistencia cruzada con el cisplatino (Di Francesco *et al.*, 2002).

El oxaliplatino es un derivado de platino de tercera generación, para el cual no se ha demostrado resistencia cruzada, posee una menor toxicidad hematológica y gástrica (Misset, 1998). Los aductos formados por este antineoplásico tienen un efecto citotóxico mayor, pues son más efectivos bloqueando la replicación del DNA (Raymond *et al.*, 1998). Se ha propuesto un mecanismo de acción adicional para el oxaliplatino, que consiste en el ataque a los grupos tiol de las proteínas recién sintetizadas (Meynard *et al.*, 2007).

2.3.3 Antraciclinas

La doxorubicina (Dox) es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, que ha sido empleado por más de 30 años en el tratamiento de diversos tumores. Se ha implementado con poco éxito en el tratamiento del CaCu (Dowdy *et al.*, 2002; du Bois *et al.*, 2007; Chen, 2008;). Su uso es limitado debido a que cerca del 10% de los pacientes tratados con Dox o sus derivados presentan complicaciones cardíacas (Octavia *et al.*, 2012). Este fármaco posee varios mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran: la intercalación en el DNA, unión cruzada de las hebras de DNA, formación de radicales libres e inhibición de la topoisomerasa II (Hortobágyi, 1997). Se ha reportado que la muerte celular inducida por Dox es dependiente de p53 y Fas (Müller *et al.*, 1998); además es capaz de activar a las caspasas- 9, -8 y -3, lo que sugiere inducción de apoptosis (Seongeun *et al.*, 2002). La inhibición de la síntesis del DNA posiblemente está relacionada con los efectos citotóxicos de la Dox, mientras que la inhibición de la topoisomerasa II probablemente es la responsable de los efectos letales de este antineoplásico.

2.3.4 Antimetabolitos

El 5-FU es un antineoplásico que pertenece a la clase de los antimetabolitos, inhibe a la sintasa de timidilato y provoca un desbalance en la producción de bases nitrogenadas, lo que afecta la fidelidad de la síntesis y reparación del DNA. Este desequilibrio en la producción de nucleótidos promueve la ruptura de las hebras maduras de DNA y posteriormente deviene la muerte celular, principalmente por apoptosis (Yoshioka *et al.*, 1985; Wataya *et al.*, 1989; Oliver *et al.*, 1996).

Otro antineoplásico de la familia de los antimetabolitos, usado en el tratamiento de CaCu, es el metotrexato. Es un antagonista del ácido fólico cuyo blanco principal es la dihidrofolato reductasa, se une a esta enzima y bloquea la reducción del hidrofolato a tetrahidrofolato. De este modo afecta las síntesis de purinas ribosiladas y pirimidinas desoxirribosiladas, pues inhibe dos pasos dependientes de folatos: el primero a nivel de la transformilasa en la vía de las purinas y el segundo a nivel de la timidilato sintetasa en la vía de las pirimidinas

(Jackson *et al.*, 1984; Fairbanks *et al.*, 1999). El desbalance en la cantidad de bases nitrogenadas interfiere con la síntesis de DNA e induce la ruptura de las hebras (Oliver *et al.*, 1996).

2.3.5 Otros antineoplásicos

La ifosfamida es un antineoplásico de la familia de las oxafosforinas, se considera que es un profármaco porque requiere ser metabolizada en el hígado para producir isofosforamida mostaza y acroleína, esta última es la especie citotóxica encargada de inhibir la proliferación celular (Sladek , 1988; Chang *et al.*, 1997). La ifosfamida es un agente alquilante que se une al DNA causando uniones cruzadas entre sus hebras, la inhibición de la síntesis de DNA y finalmente la apoptosis (Zhang *et al.*, 2006).

Otro fármaco empleado en el tratamiento de CaCu es el paclitaxel, pertenece a la familia de los taxanos e induce muerte celular a través de la estabilización de los microtúbulos (de Bree *et al.*, 2006), lo que lleva a la formación de un uso mitótico multipolar y culmina en catástrofe mitótica (Weaver *et al.*, 2005).

2.4 Efectos secundarios de la quimioterapia

Dado que la QT es una terapia sistémica, los agentes antineoplásicos entran al torrente sanguíneo y son capaces de alcanzar diferentes órganos y tejidos, lo que tiene como consecuencia el daño a células de los órganos que se encuentran en constante proliferación como la médula ósea, la mucosa gastrointestinal, gónadas y folículos pilosos. El daño a las células sanas es temporal pues generalmente éstas cuentan con mecanismos de reparación más eficientes que las células tumorales.

Los efectos adversos causados por la QT dependen del tipo de antineoplásico, la cantidad recibida y la duración del tratamiento. Los efectos adversos pueden clasificarse de acuerdo a la temporalidad con que estos ocurren (Wilkes, 1996).

Aparición inmediata, se presentan en horas o días posteriores a la administración de la QT consisten en: náuseas, vómito, flebitis, anafilaxia, falla renal, hipertensión e hipotensión.

Aparición temprana, se presentan en días o semanas posteriores a la QT agrupan a: la leucopenia, la trombocitopenia, la alopecia, la estomatitis, la diarrea y la megaloblastosis, entre otros.

Aparición retardada, se presentan en semanas o meses posteriores a la QT consisten en: anemia, aspermia, daño hepatocelular, hiperpigmentación, fibrosis pulmonar, entre otros.

Aparición tardía, se presenta en meses o años posteriores a la QT agrupan a: la esterilidad, el hipogonadismo, la menopausia prematura y las neoplasias secundarias, entre otros.

Dentro del grupo de efectos adversos de aparición retardada, la anemia es uno de los eventos que constituye por sí misma un factor relacionado a un mal pronóstico y a una sobrevida reducida (Caro *et al.*, 2001).

2.5 Anemia

La OMS define a la anemia, como niveles de hemoglobina (Hb) por debajo de 12 g/dL en mujeres y 13 g/dL en varones. En raras ocasiones la anemia constituye una enfermedad por si sola, generalmente es consecuencia de padecimientos crónicos como el cáncer. Algunos síntomas de la anemia son: fatiga, astenia, palidez, incremento del ritmo cardíaco y dolor de cabeza. La severidad de los síntomas está en función de la severidad de la anemia, en casos extremos el daño puede llegar a órganos como riñones, el sistema inmune, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular (Carameloa *et al.*, 2007; Shander *et al.*, 2011).

La anemia es una complicación frecuente en pacientes con cáncer y sus síntomas pueden comprometer la calidad de vida del paciente y su capacidad para tolerar o responder ante el tratamiento.

2.5.1 Anemia en pacientes con cáncer cervicouterino

En México el 37 % de las pacientes con CaCu presentan niveles de Hb menores o iguales a 12 g/dL al iniciar el tratamiento (Candelaria *et al.*, 2005); desafortunadamente la anemia está ligada a un mal pronóstico en pacientes con

CaCu (Evans *et al.*, 1965). Esta observación tiene su primer antecedente en el trabajo de Evans y Bergsjö publicado en 1965, el cual incluyó más de 1000 pacientes con CaCu, tratadas con RT, en un período que abarcó de 1948 a 1958, en el Hospital Radium en Oslo. Las pacientes que fueron sometidas a RT con niveles de Hb menores a 11 g/dL mostraron una menor sobrevida, comparadas con aquellas con niveles de Hb iguales o mayores a 11 g/dL, lo que permitió establecer una relación lineal entre los niveles de Hb y la sobrevida de las pacientes. Estudios posteriores han apoyado estas observaciones para CaCu y otras neoplasias sólidas (Kapp *et al.*, 1983; Bush, 1986; Girinski *et al.*, 1989; Pedersen *et al.*, 1995; Frommhold *et al.*, 1998; Grau *et al.*, 1998; Caro *et al.*, 2001). El metanálisis realizado por Caro *et al.*, 2001 estableció que la anemia, constituye un factor pronóstico independiente, relacionado con un incremento en las tasas de mortalidad de varios tumores sólidos y neoplasias hematológicas.

La anemia asociada a procesos tumorales tiene un origen multifactorial, puede ser una consecuencia directa del crecimiento del tumor o producto indirecto de las citocinas liberadas por el tumor o el tratamiento del mismo.

Efectos directos del tumor. Los procesos tumorales pueden causar anemia de manera directa mediante hemorragias e infiltración de la médula ósea por células tumorales (Barón González *et al.*, 2005).

Efectos indirectos del tumor. En la mayoría de los casos la anemia es consecuencia indirecta del tumor, resultado de factores múltiples como:

- a) Citocinas: se cree que algunas citocinas producidas por el tumor como la interleucina-1, los interferones β y γ , el factor de necrosis tumoral α y el factor transformante de crecimiento β ; pueden provocar hemólisis autoinmune, o bien reducir la producción y capacidad de respuesta ante la eritropoyetina. Este tipo de anemia suele desarrollarse lentamente (Barón-González *et al.*, 2005).
- b) RT y QT: el tratamiento empleado en el manejo de pacientes con cáncer también está involucrado en el desarrollo de la anemia. La RT y QT pueden suprimir la capacidad de la médula ósea para producir eritrocitos. Estudios han demostrado que entre el 10% y 40% de pacientes tratados con cisplatino desarrollan anemia. A pesar de que la mayoría de los

tratamientos inducen la supresión de la médula ósea lo hacen a corto plazo, aunque existe evidencia que apoya la posibilidad de problemas a largo plazo en la producción de eritrocitos (Barón-González *et al.*, 2005).

- c) Infecciones por inmunosupresión: la supresión de la médula ósea también afecta al sistema inmune, esto puede derivar en infecciones que impactan en las función de la médula ósea, lo que tiene como resultado la anemia o una exacerbación de la misma (Barón -González *et al.*, 2005).
- d) -González *et al.*, 2005).

En estos casos es habitual que coexistan más de un tipo de anemia, por ejemplo: la de trastornos crónicos y la inducida por tratamientos.

2.5.2 Tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer

Existen dos estrategias principales para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer. La primera consiste en transfusiones sanguíneas, aunque presenta desventajas como la escasez de donantes, el riesgo de exponer al receptor a agentes infecciosos como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Cumming *et al.*, 1989; Shander *et al.*, 2011) o el Virus de la Hepatitis C (Donahue *et al.*, 1992) y también se ha asociado a un incremento en la recurrencia de la neoplasia (Blumberg *et al.*, 1988; Eisenkop *et al.*, 1990).

La segunda estrategia es el uso de la eritropoyetina humana recombinante (Epo), disponible desde 1989 y aprobada en 1993 por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la anemia en pacientes con tumores sólidos bajo regímenes de QT, no así para pacientes con neoplasias hematológicas. En 2002, la Epo hiperglicosilada (darbopoyetina α) y los Agentes Recombinantes Estimuladores de la Eritropoyesis (AREEs) se aprobaron para el tratamiento de pacientes con cáncer que reciben QT; y se introdujeron al mercado europeo para su uso en la nefrología, oncología y cirugía (Jelkmann, 1992).

A pesar de que la anemia de pacientes con cáncer es multifactorial y sólo una pequeña porción se debe a una deficiencia en la producción de Epo, la

administración de esta hormona y sus análogos, ha reducido substancialmente el número de pacientes que requieren transfusiones sanguíneas y los riesgos asociados a éstas (Hodges *et al.*, 2007).

2.5.3 Administración de la Epo a pacientes con cáncer

La terapia con Epo recombinante se ha convertido en el estándar para tratar anemias de origen renal y no renal. En pacientes con cáncer, la Epo mantiene a la Hb en niveles cercanos a los obtenidos con transfusiones sanguíneas. A pesar de lo anterior desde que la Epo comenzó a emplearse, surgieron inquietudes acerca del papel que podría jugar una citocina, cuya principal función es promover la diferenciación y evasión de la muerte celular de los progenitores eritroides (Hardee *et al.*, 2006).

La Epo se produce principalmente en el riñón, aunque otros tejidos y órganos como el hígado, el sistema nervioso, el tracto genital femenino y los testículos, también son capaces de producir esta hormona (Lacombe *et al.*, 1999; Hardee *et al.*, 2006). En un inicio se creyó que la expresión del receptor para la Epo (EpoR) se limitaba a los progenitores eritroides, sin embargo, su presencia se ha detectado en linajes celulares como el endotelio, células del sistema nervioso, mioblastos y megacariocitos (Farrell *et al.*, 2004). De manera sorpresiva, varios trabajos han reportado que el EpoR también se expresa en biopsias o líneas celulares de cáncer de mama (Acs *et al.*, 2001), hígado pulmón, sistema nervioso (Batra *et al.*, 2003) y cuello del útero (Leo *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2011), por mencionar algunos. Por lo que se ha sugerido que la administración de la Epo, podría ser contraproducente para las terapias que se encargan de inducir muerte celular.

Estas evidencias dieron pie a la controversia del uso de la Epo y los AREEs en pacientes con cáncer. Algunos grupos han observado que esta hormona mejora la calidad de vida del paciente y la respuesta a la QT que no está basada en cisplatino (Littlewood *et al.*, 2001; Littlewood *et al.*, 2003). El metanálisis más reciente realizado por el grupo de Apro *et al.*, 2012, concluyó que la Epo no tiene un efecto sobre la progresión de las neoplasias, aunque estudios individuales sugieren que en ciertos casos la administración de Epo puede comprometer la respuesta al tratamiento (Apro *et al.*, 2012). Esto

contrasta con los trabajos de Henke M *et al.* 2003 y Leyland-Jones B *et al.* 2003 realizados en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de mama, respectivamente; los cuales concluyeron que a pesar de que la Epo incrementa los niveles de Hb, tiene un impacto negativo sobre el control del tumor y la sobrevivencia de pacientes tratados con RT y Epo. El grupo de Henke *et al.* 2003 propuso que la Epo activa vías antiapoptóticas; aunque no demostró que los tumores expresaran el EpoR. Es importante señalar que al finalizar el estudio, los niveles de Hb fueron de 14 g/dL en mujeres y 15 g/dL en hombres, lo que sugiere que el impacto negativo de la Epo podría deberse a un sobretratamiento. Por su parte, en el estudio de Leyland-Jones *et al.*, 2003 observaron un incremento en la mortalidad del grupo que recibió Epo, este resultado fue atribuido al incremento de eventos trombóticos, y a la progresión o recurrencia de los tumores en las pacientes tratadas con Epo. Finalmente, el último metanálisis realizado por Bohlius J *et al.*, 2009 no es concluyente, pues reporta un incremento del 10% en la mortalidad de pacientes con cáncer tratados con Epo, aunque este resultado carece de significancia estadística y concluye que este evento puede presentarse cuando los pacientes son tratados con RT, pero en la QT posiblemente está ausente.

Dada la controversia que persiste para el uso de la Epo, la Sociedad Americana de Oncología Clínica y la Sociedad Americana de Hematología (Rizo *et al.*, 2008), ha emitido una serie de recomendaciones con respecto al uso de Epo, éstas sugieren el uso de AREEs cuando la Hb está en niveles iguales o menores a 10 g/dL y para pacientes con bajo riesgo de mielodisplasia. También se aconseja monitorear los niveles de hierro, así como ser cautelosos con los regímenes de QT y los estados clínicos asociados a eventos trombóticos.

2.6 Papel de la Epo y su receptor en el tratamiento del cáncer cérvicouterino

Del mismo modo que se ha reportado la expresión de la Epo y el EpoR en otros tejidos u órganos sanos, su presencia se ha detectado en tumores de CaCu (Yasuda *et al.*, 1998; Acs *et al.*, 2003; 1998; Lopez *et al.*, 2011). En 2003 Acs y colaboradores, demostraron que la expresión del EpoR es regulada positivamente por hipoxia en las líneas celulares HeLa y SiHa de CaCu y que la

Epo inhibe de manera dosis dependiente el efecto citotóxico del cisplatino; además establecieron una correlación entre el grado de la lesión y la expresión del EpoR. En cuanto a la expresión de la Epo, hallaron que es mayor en las zonas de displasia, necrosis y queratinización comparada con las zonas benignas (Acs *et al.*, 2003). Estos resultados son apoyados por otro estudio realizado en biopsias de pacientes con CaCu, en donde se observó por inmunohistoquímica la presencia de Epo y del EpoR en el 88% de las biopsias analizadas. En este trabajo la expresión de Epo se asoció a una reducción significativa en la supervivencia de los pacientes y el EpoR se relacionó con un mayor tamaño del tumor (Leo *et al.*, 2006).

Los reportes clínicos de pacientes con CaCu tratados con QT y/o RT combinada con Epo, tampoco son concluyentes. El trabajo de Temkin *et al.* 2006 que incluyó 68 pacientes, de las cuales sólo 18 fueron tratadas con Epo y QT; reportó una recurrencia del 61% en las pacientes tratadas con Epo contra 30% del control, al finalizar el estudio la supervivencia de las pacientes tratadas con Epo fue del 44% en comparación con un 72% del grupo control. Siguiendo esta línea, un estudio dirigido por Lavey *et al.*, 2004 reportó que sólo el 40% de las pacientes tratadas con Epo incrementaron de manera efectiva sus niveles de Hb y observó un aumento en la frecuencia de eventos trombóticos.

Por el contrario, los estudios realizados por Strauss *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009 y Blomer *et al.* 2011 han reportado que la Epo no afecta la supervivencia de las pacientes y mejora su calidad de vida. El trabajo realizado por el grupo Blohmer JU *et al.* 2011 es el estudio con el mayor número de pacientes (257) y el periodo de seguimiento más largo (5 años). Durante el estudio no se hallaron diferencias significativas en la supervivencia libre de recurrencia del tumor y se observó una tendencia positiva en la respuesta de las pacientes tratadas con Epo y QT, comparadas con el grupo control que sólo recibió QT. La observación anterior es apoyada por el estudio de Strauss *et al.*, 2008 que incluyó 74 pacientes: 40 en el grupo control y 34 en el grupo tratado con Epo. En él tampoco se hallaron diferencias significativas en la presencia de eventos trombóticos, ni en la supervivencia total o libre de recurrencia. Finalmente, en el trabajo dirigido por Gupta *et al.*, 2009 que incluyó 120 pacientes, 60 en el grupo tratado con Epo y 60 en el grupo control, reportó que el conjunto que recibió Epo,

declaró una mejora en la calidad de vida y no reportaron eventos trombóticos o diferencias significativas en la sobrevivencia total.

2.6.1 Señalización de la Epo y su receptor

La Epo es una glicoproteína de 30.4 kDa que previene la apoptosis, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea. La producción insuficiente de Epo es la principal causa de anemia en enfermedades renales crónicas, debido a que esta hormona se produce principalmente en el riñón adulto, en las células intersticiales de la corteza renal (Koury *et al.*, 1990), bajo un mecanismo que es sensible a los niveles de oxígeno (Beru *et al.*, 1986). La Epo regula una producción diaria de 2×10^{11} eritrocitos, lo cual mantiene la capacidad acarreadora de oxígeno a sangre periférica en condiciones fisiológicas (Jelkmann, 1992). Los tejidos con bajos niveles de oxígeno inducen la expresión del gen de la Epo a través de la activación transcripcional y la estabilización del mRNA de Epo (Ebert *et al.*, 1999). La regulación transcripcional de la Epo dependiente de hipoxia es resultado directo de la activación del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1), que se une a elementos de respuesta a hipoxia en el extremo 3' del gen de Epo (Beck *et al.*, 1993). Además de la hipoxia, la hipoglucemia, los niveles elevados de calcio intracelular, la liberación de insulina, los estrógenos, los esteroides androgénicos y varias citocinas están involucrados en la producción de Epo (Jelkmann, 1992).

La Epo ejerce sus efectos a través de la unión a su receptor homónimo (EpoR), el cual se encuentra anclado a la membrana celular (Figura 1). El EpoR es una proteína de 507 aminoácidos con una masa molecular de 56 kDa, no posee actividad catalítica intrínseca y es miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I. La unión de Epo a EpoR provoca la dimerización de éste y promueve un cambio conformacional que acerca a las dos cinasas de tirosina JAK2, previamente ancladas al receptor. De este modo las cinasas quedan en suficiente proximidad para transfosforilarse y activarse (Remy *et al.*, 1999). Una vez que las JAK2 se han activado, fosforilan residuos de tirosina en el EpoR que sirven para el anclaje de proteínas señalizadoras con dominios SH2 (Dusanter-Fourt *et al.*, 1992; Dusanter-Fourt *et al.*, 1994). La cinasa JAK2 es capaz de

fosforilar y activar a la proteína STAT-5 que se transloca al núcleo y promueve la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-XL (Socolovsky *et al.*, 1999). La Epo también promueve la división celular de las unidades formadoras de colonias eritroides tempranas (BFU-e) al estimular la expresión de c-myc (Umemura *et al.*, 1988), la activación de PI3-K (Damen *et al.*, 1995) y de las MAP cinasas (Bittorf *et al.*, 1994).

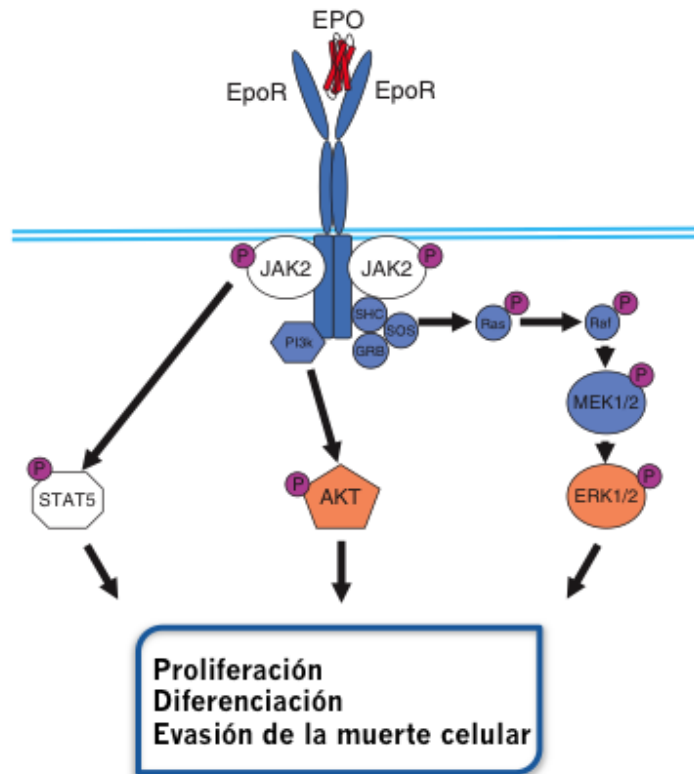


Figura 1. Cuando la Epo se une a el EpoR, se produce un cambio conformacional, que provoca el acercamiento y transfosforilación de las cinasas JAK2, ancladas previamente al receptor. Una vez activadas las cinasas JAK2, fosforilan diferentes residuos de tirosinas presentes en el EpoR que sirven como sitio de anclaje para proteínas con dominios SH2, como resultado varias vías son activadas entre ellas: PI3-K/AKT, STAT-5 y las MAPKs, las cuales participan en procesos de evasión de la muerte celular, proliferación y diferenciación (Modificado de Apro M, 2012).

Se ha reportado que el receptor para el factor de células troncales (SCF) KIT también interactúa con el EpoR, para potenciar la proliferación y diferenciación de células eritroides (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997).

El principal regulador negativo del EpoR es la fosfatasa SH-PTP1, la cual es reclutada por el dominio SH2 presente en el EpoR y se une al residuo de tirosina fosforilada 429, para catalizar la desfosforilación de las cinasas JAK2 (Klingmüller *et al.*, 1995). Otro regulador negativo es la proteína Cis-1 que se une

a la tirosina fosforilada 401, sitio de anclaje para STAT-5, de este modo impide el anclaje de STAT-5 y se interrumpe la señalización de Epo (Matsumoto *et al.*, 1997).

2.6.2 Epo y NF- κ B

Además de las vías de STAT-5, PI3K/AKT y las MAP cinasas, la Epo también es capaz de activar la vía de NF- κ B en células neuronales. Se ha propuesto que la activación de este factor de transcripción requiere que JAK2 fosforile residuos de tirosina del inhibidor de NF- κ B, I κ B- α , lo que promueve su disociación y la translocación de éste hacia el núcleo. Cuando Epo activa a NF- κ B promueve neuroprotección en células sometidas a hipoxia (Digicaylioglu *et al.*, 2001). Este fenómeno, también se ha observado en células HeLa transfectadas con el gen que codifica para EpoR, sin embargo, en este caso la activación de NF- κ B no depende de la degradación de I κ B- α por el proteasoma como sucede en la vía canónica (Pajonk *et al.*, 2004).

2.7 Vía de señalización clásica de NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B fue descubierto como parte de la maquinaria de transcripción de los genes de la cadena κ de las inmunoglobulinas, participa en el control de diversos procesos celulares como la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmunológica, el control de proliferación y sobrevivencia celular (Lopez-Bojorquez, 2004; Baeuerle *et al.*, 1996). A pesar de que suelen atribuirle efectos antiapoptóticos, el grupo de Ryan *et al.*, 2000 demostró que NF- κ B es necesario para la apoptosis dependiente de p53. La activación constitutiva de NF- κ B se ha asociado con distintos tipos de cáncer y otras enfermedades como diabetes, inflamación crónica y enfermedades cardiovasculares (Caamaño *et al.*, 2002; Pikarsky *et al.*, 2004; Rudofsky *et al.*, 2004).

NF- κ B es un homo o heterodímero formado por dos subunidades proteicas que se agrupan dentro de la familia Rel. En mamíferos esta familia se integra por cinco miembros: p65 (también denominada RelA), c-Rel, RelB, p105

(precursora de p50) y p100 (precursora de p52). Todas las proteínas de esta familia tienen un dominio de 300 aminoácidos en el extremo amino llamado Rel, que es el responsable de la dimerización, la unión al DNA y la interacción con las proteínas inhibidoras I κ Bs. Los dímeros de NF- κ B forman al factor de transcripción activo, que regula la expresión genética al unirse a secuencias específicas localizadas en la región promotora de los genes blanco (Müller *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 1998). De las diversas combinaciones de dímeros, el más abundante y el mejor estudiado es el que forman p50 y p65 (Moynagh, 2005).

En la vía clásica de NF- κ B, un estímulo promueve la activación de las cinasas de I κ B α (IKKs), las cuales fosforilan dos residuos conservados de serina (S32/S36) de la moléculas de I κ B α . La fosforilación de I κ B α , promueve que sea poliubiquitinado por el complejo SCF- β -TrCP, y marca a la proteína para ser reconocida y degradada por la subunidad 26S del proteasoma, lo que permite la translocación del NF- κ B al núcleo. Una vez en el núcleo, NF- κ B se une los elementos de respuesta κ B en la región promotora de distintos genes (Figura 2).

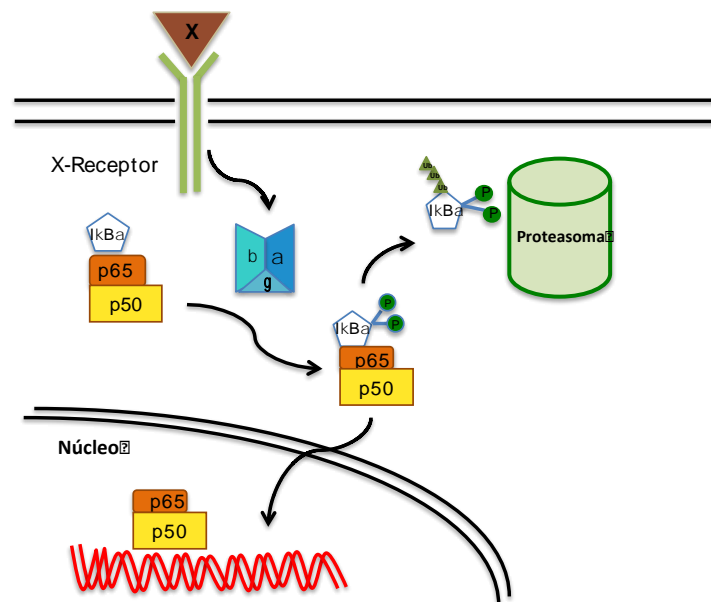


Figura 2. Vía de NF- κ B. La unión de un ligando X a su receptor, promueve la activación de las cinasas IKKs (α , β , γ) las cuales fosforilan residuos de serina (S32/S36) presentes en I κ B α , esto lo marca para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma, mientras que NF- κ B queda libre para translocarse al núcleo y unirse a sus secuencias blanco.

3. Antecedentes

En nuestro laboratorio se ha observado que la Epo ejerce un efecto diferencial sobre células de CaCu, pues protege a la línea celular HeLa de la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifen (Vázquez-Mellado, 2009); aunque cuando su uso se combina con las antraciclinas: daunorrubicina y Dox, incrementa la citotoxicidad de estos antineoplásicos hasta en un 21% (Rojas, 2010). Por tanto la Epo es capaz de promover efectos opuestos dependiendo del quimiofármaco con que sea combinada, puede promover protección o quimiosensibilizar a las células tumorales de CaCu ante la muerte inducida por quimioterapia.

El trabajo de Panjok F *et al.*, 2004 demostró que la Epo es capaz de activar a NF- κ B en células HeLa, evento que también es promovido por la Dox (Tergaonkar *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que NF- κ B probablemente está implicado en el efecto citotóxico de Epo, pues este factor de transcripción puede actuar como promotor de supervivencia o muerte celular.

4. Justificación

El CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres mexicanas; de esta población el 37% presenta anemia al iniciar el tratamiento, porcentaje que puede llegar al 80 o casi el 100% al finalizar el tratamiento (Candelaria *et al.*, 2005). Debido a que la anemia está asociada a un pobre pronóstico (Caro JJ, 2001) corregirla es una prioridad. En México la principal alternativa para tratar la anemia en pacientes con cáncer, es el uso de la rHuEpo (López *et al.*, 2008). Sin embargo, observaciones previas sugieren que la Epo es capaz de proteger a las células tumorales de CaCu, de la muerte inducida por cisplatino. Por tanto, es importante buscar esquemas de tratamiento que detengan la progresión del tumor sin comprometer la respuesta al tratamiento.

5. Hipótesis

El incremento en la citotoxicidad de la Dox, inducido por la Epo, es mediado por el factor transcripcional NF- κ B.

6. Objetivo general

Determinar si el factor de transcripción NF- κ B está involucrado en el incremento de la citotoxicidad de la Dox, promovido por la Epo, en línea celular HeLa de CaCu.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar la activación de NF- κ B por Epo y Dox
 - Mediante la detección de p65 en citoplasma por western blot
 - Evaluar la unión de NF- κ B a su elemento de respuesta
- Evaluar el papel de la cinasa JAK2 en la activación de NF- κ B

7. Materiales y métodos

7.1 Material biológico y reactivos

Como modelo experimental se empleó a la línea celular HeLa de CaCu, que tiene integrado el genoma del VPH-18. La Dox y la rHuEpo (Exetin-A, solución inyectable PiSA) fueron compradas a los laboratorios PiSA, México. El inhibidor de JAK2, la tirfostina AG490, fue comprada a Sigma Aldrich, E.U.A.

7.2 Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *In Vitro*) suplementado con 2% de suero fetal bovino (By Productos) inactivado (Apéndice I) y 0.5% de antibiótico penicilina-estreptomina (10 000 U de penicilina, 10 000 ug de estreptomina, *In Vitro*), en incubación a 37°C y al 5% de CO₂.

Los cultivos se dividieron cada vez que presentaron una confluencia del 80%, para ello se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS a 4°C (Apéndice II), posteriormente se agregaron 2 mL de verseno (*In Vitro*) y las células se incubaron a 37 °C durante 5 min, transcurrido este tiempo las células se desprendieron y centrifugaron a 3000 rpm por 5 min, finalmente se retiró el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de DMEM a 37 °C, para ser resembrado en 7 mL de DMEM en una caja petri e incubarse nuevamente a 37 °C y al 5% de CO₂.

7.3 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), se basa en una reacción realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que transforma el MTT en un compuesto color violeta (formazán), lo que permite determinar la función mitocondrial de las células tratadas.

Este método se emplea para medir de manera indirecta la sobrevivencia y proliferación celular, bajo el supuesto de que la cantidad de células vivas es proporcional a la densidad óptica producida por los cristales de formazán.

Para realizar el ensayo de MTT, posterior al tratamiento, se retiró el medio de las células y se agregaron 200 uL de medio fresco a 37 °C y 50 uL de MTT (0.5 mg/mL, apéndice III), posteriormente las células se incubaron durante 2 h a 37 °C, pasado este tiempo se retiró cuidadosamente el medio con MTT, los cristales formados por la reacción de óxido-reducción se disolvieron en 100 uL de isopropanol. Finalmente, la solución de los cristales fue transferida a una placa de 96 pozos nueva, para leer las absorbancias a 570 nm en un lector de placas (Bio- Tek, ELx-800).

7.4 Ensayos para determinar el efecto de Epo sobre la muerte inducida por Dox

Para los ensayos con Epo (Exetin-A, solución inyectable PiSA), se sembraron 50 000 células/pozo en placas de 96 pozos, la placa fue incubada a 37 °C por 2 h para permitir que las células se adhirieran. Posteriormente, se realizó una curva dosis respuesta en un rango de 1 a 200 U/mL. Las células fueron incubadas nuevamente por 2 h, y se agregó la DL₅₀ de la Dox. Cada pozo fue llevado a un volumen final de 200 uL y las células fueron incubadas durante 24 h, transcurrido este tiempo se realizó un ensayo de MTT.

7.5 Extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares

Se sembraron 2×10^6 células HeLa en placas de 6 pozos y se incubaron 2 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con Epo y/o Dox por diferentes periodos, de acuerdo al objetivo de cada experimento. Para extraer la proteína las células se lavaron dos veces con PBS a 4 °C y se despegaron raspando, se centrifugó 5 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y se incubó en hielo seco durante 1 h o a -80 °C toda la noche. Para romper las células y extraer la fracción citoplásmica, se utilizó un amortiguador hipotónico (Apéndice IV) con el que fueron incubadas por 10 min, después se centrifugó por 10 min a 3000 rpm,

se extrajo el sobrenadante y se almacenó a -80 °C. Una vez separada la fracción citoplásmica, los restos celulares fueron lisados con un amortiguador hipertónico (Apéndice V), para ello se incubó en agitación por 30 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 25 min, se extrajo el sobrenadante que se almacenó a -80 °C. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) y la absorbancia fue leída a 595 nm.

7.6 Western Blot

Los extractos citoplásmicos y nucleares, provenientes de los diferentes tratamientos, se corrieron a 120 V en un gel SDS-PAGE al 10% (Apéndice VI a X) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), a 300 mA durante 100 min a 4 °C. La membrana se dejó secar, fue bloqueada durante 1 h con leche al 5% disuelta en TBS-Tween (Apéndice XI y XII). De acuerdo al experimento, se incubó con los siguientes anticuerpos: anti-p65 (Santa Cruz) 1:1000, anti-p50 (Santa Cruz) 1:1000, anti- β actina (Abcam) 1:1000, anti-GAPDH 1:2500. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween y se incubó por 2 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario respectivo acoplado a peroxidasa, las diluciones empleados fueron las siguientes: anti-conejo 1:5000, anti-ratón 1:3000 (Invitrogen) y anti-cabra 1:5000 (Zymed), después de la incubación las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween. Para determinar la presencia de las proteínas buscadas, se utilizó el kit de luminol Millipore con una película sensible a luz blanca, y por último se reveló y fijó con soluciones Kodak.

Para realizar las densitometrías se utilizó el programa Image J (NIH image) y al menos dos ensayos independientes de Western blot fueron considerados para realizar los gráficos.

7.7 Ensayo de inhibición de JAK2 con tirfostina AG490

Las células se sembraron a una densidad de 50 000 células/pozo en placas de 96 pozos. Se permitió que se adhirieran durante 2 h y se preincubó 1 h con el inhibidor AG490 (Sigma-Aldrich, apéndice XV) a una concentración de 10 μ M,

luego se adicionó la rHuEpo (100 U/mL) y se incubó por 2 h, entonces se agregó la DL₅₀ de la Dox y transcurridas 24 h se realizó un ensayo de MTT .

7.8 Ensayo de unión de NF-κB a su elemento de respuesta

Una vez que las células recibieron el tratamiento deseado, se realizó un fraccionamiento nuclear y citoplásmico. Una fracción de la proteína nuclear fue cuantificada por Bradford y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, con oligonucleótidos específicos para NF-κB, marcados con fósforo 32 [$\gamma^{32}\text{P}$]. Como control, otra fracción de la proteína fue incubada con un oligonucleótido mutado. Las muestras se corrieron en un gel no desnaturizante de acrilamida al 4%. Posteriormente el gel se secó y la unión de NF-κB a su secuencia blanco se detectó por autoradiografía.

7.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la regresión lineal fue realizado con el programa Excell 2010 (Microsoft). Para analizar el efecto de la Epo sobre la muerte celular inducida por Dox, se empleó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0., los resultados fueron analizados con una ANOVA seguida de la prueba de Tukey, a una significancia de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1 La Epo incrementa la citotoxicidad de la Dox

En la clínica, previo al inicio del tratamiento con QT, las pacientes con anemia reciben Epo para corregir esta condición. Durante este trabajo, observamos que al tratar las células HeLa con Epo y Dox, el efecto citotóxico del quimiofármaco se incrementa de manera dosis dependiente (Figura 3). El efecto máximo se observó con 200 U/mL de Epo, en esta condición la viabilidad celular disminuyó hasta un 30% comparada con la DL₅₀. Para descartar que las concentraciones de Epo empleadas fueran citotóxicas por si solas, un segundo grupo de células fue tratado con las mismas dosis de Epo pero en ausencia de Dox. De acuerdo a nuestros resultados, la Epo no induce una disminución en la viabilidad celular.

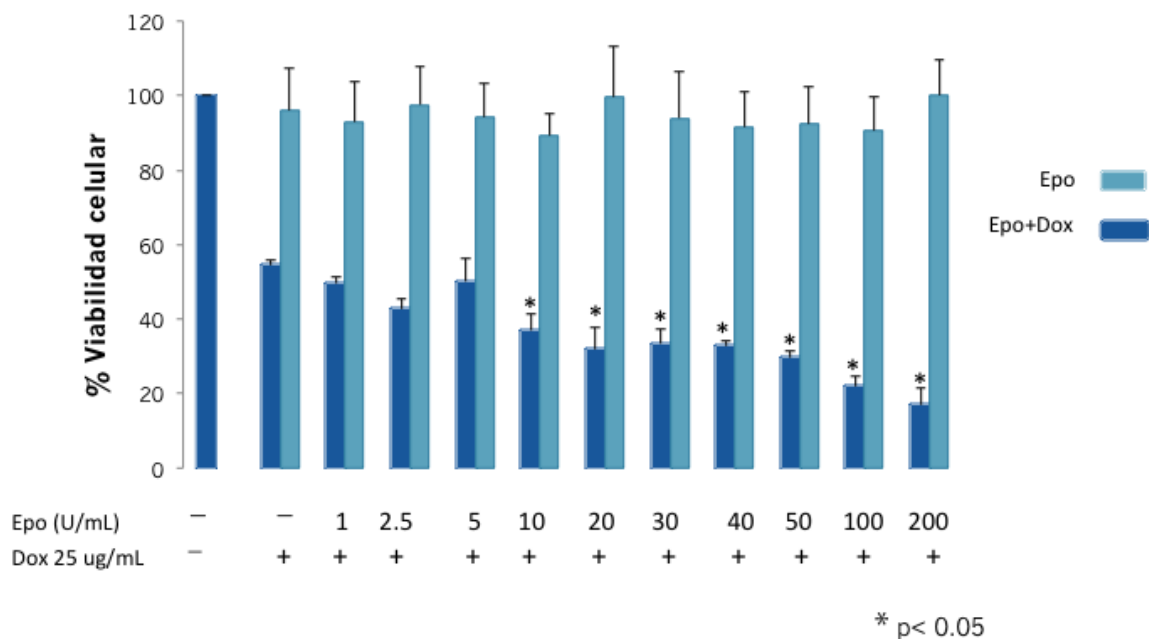


Figura 3. La combinación de la Epo con Dox disminuye la viabilidad celular. Las células se incubaron durante 2 h con las concentraciones indicadas de Epo y posteriormente se adicionó la DL₅₀ de Dox. Un segundo grupo de células fue incubado sólo con las concentraciones de Epo indicadas. Transcurridas 24 h se realizó un ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes.

8.2 El tratamiento con Epo y/o Dox promueven la disminución de p65 en citoplasma

Se ha reportado que la Epo y la Dox son capaces de inducir la translocación de NF- κ B al núcleo, factor de transcripción capaz de inducir muerte celular (Pajonk *et al.*, 2004; Digicaylioglu *et al.*, 2001). Basadas en esta información, decidimos realizar extractos proteicos citoplásmicos y nucleares, para determinar por western blot si la combinación de Epo con Dox, promueve una disminución de NF- κ B en el citoplasma.

De acuerdo con lo reportado, observamos que la Epo y la Dox promueven la disminución de p65 en citoplasma. Pero, cuando ambos estímulos son combinados la disminución de p65 se acentúa (Figura 4). Esto sugiere que probablemente la activación de NF- κ B está asociada al incremento del efecto de la Dox promovido por Epo.

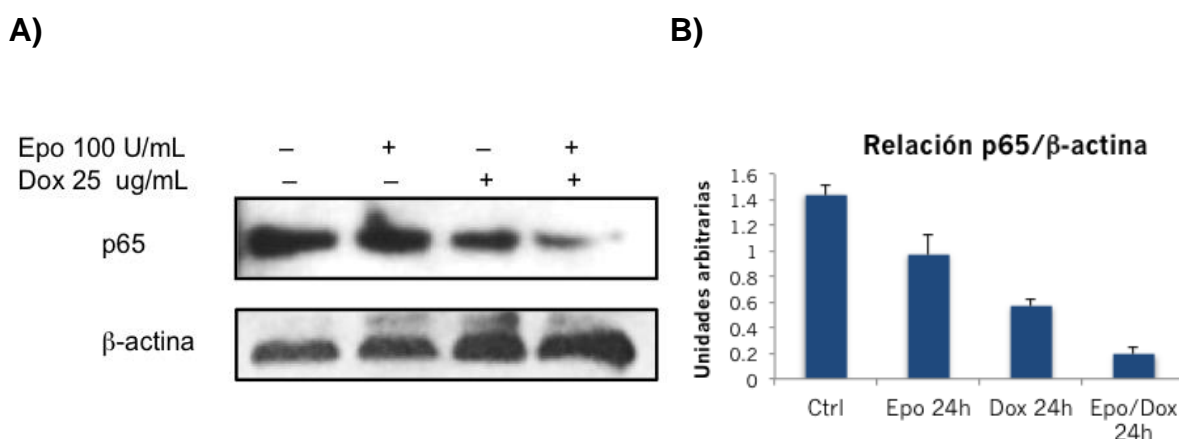


Figura 4. La combinación de Epo y Dox promueve la disminución de p65 en citoplasma. Las células HeLa fueron tratadas con Epo 100 U/mL, Dox 25 ug/mL, con una combinación de ambos tratamientos o bien dejadas sin tratar. Transcurridas 24 h se obtuvieron extractos citoplasmáticos y se detectó la presencia de p65 por western blot (A) la cantidad de p65, con respecto a su control de carga, fue cuantificada por desitometría (B). Se realizaron tres ensayos independientes.

La familia de NF- κ B está formada por cinco proteínas que pueden asociarse entre si para generar la forma activa del factor de transcripción. El dímero más estudiado por su abundancia es el integrado por p65 y p50. Por esta razón, decidimos determinar si los niveles de p50 eran afectados de la misma manera por Dox y Epo. En este caso observamos que los niveles de esta

proteína también disminuyen en el citoplasma de células tratadas con Epo y Dox, aunque la combinación de estos estímulos no modifica los niveles de p50 más allá de lo inducido por la Dox sola (Figura 5). Por tanto, la subunidad que se asocia con p65 y que es afectada por la combinación de Epo y Dox, debe de ser otro miembro de esta familia de proteínas.

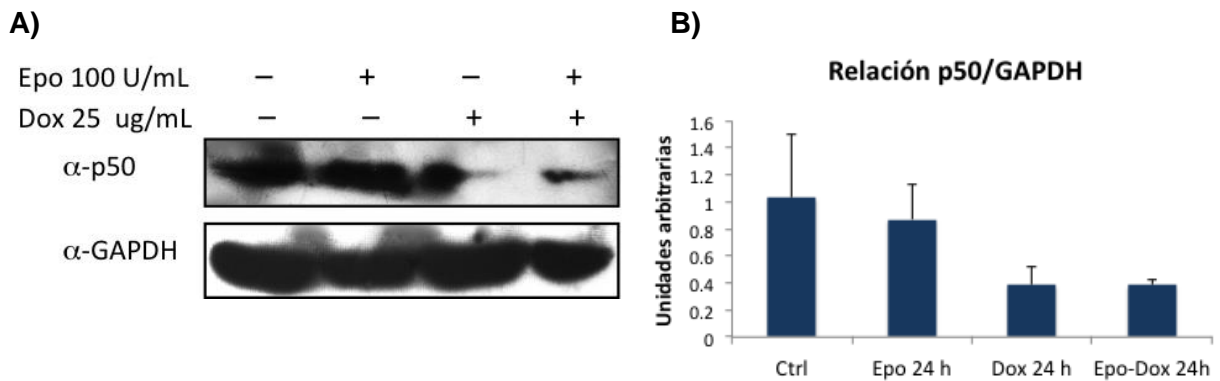


Figura 5. La combinación de Epo y Dox no modifica los niveles de p50 en citoplasma en comparación con la administración de estímulos por separado. Las células HeLa fueron tratadas con Epo 100 U/mL, Dox 25 ug/mL, con una combinación de ambos tratamientos o bien dejadas sin tratar. Transcurridas 24 h se obtuvieron extractos citoplasmáticos y se detectó la presencia de p50 por western blot (A) la cantidad de p65, con respecto a su control de carga, fue cuantificada por desitometría (B). Se realizaron tres ensayos independientes.

8.3 La Epo promueve la disminución de p65 en el citoplasma

La activación de NF- κ B por Dox ha sido ampliamente estudiada, nuestros resultados sugieren que dicha activación puede incrementarse por la administración de Epo. Sin embargo, el efecto de esta citocina sobre la activación de NF- κ B no se ha descrito completamente. Por esta razón decidimos evaluar si los niveles de EpoR presentes en nuestra células eran suficientes para inducir la activación de NF- κ B por Epo en células HeLa. Las células fueron estimuladas con 100 U/mL de Epo y se realizaron extractos citoplasmáticos a las 0.5, 1 y 2 h (Figura 6). De manera inesperada observamos que la Epo es capaz de disminuir de manera gradual y sostenida los niveles de p65 en citoplasma, pues 2 h posteriores a la administración del estímulo, la cantidad de p65 en el citoplasma continúa disminuyendo, lo que sugiere que la Epo posiblemente activa una vía diferente de la canónica, pues estímulos clásicos como TNF- α producen el pico de activación en los 30 minutos posteriores al estímulo.

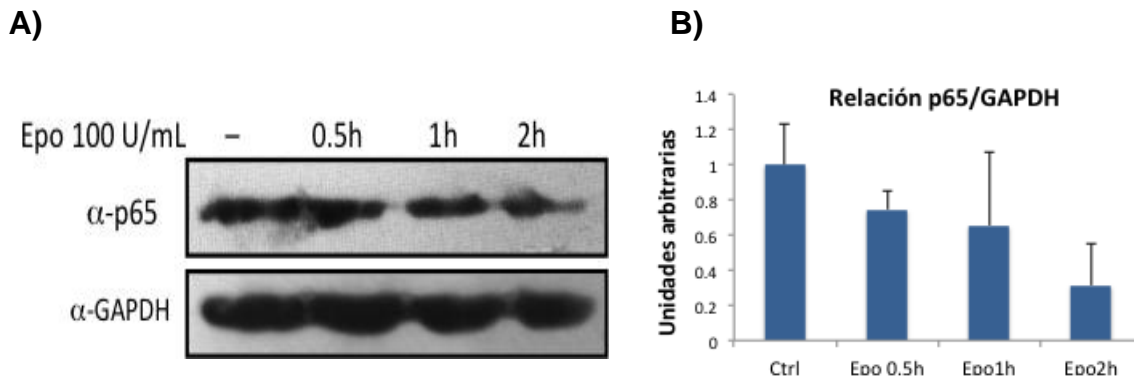


Figura 6. La Epo promueve la disminución de p65 en citoplasma de manera gradual y sostenida. Las células HeLa fueron tratadas con 100 U/mL de Epo durante 0.5 h, 1 h y 2 h. Se obtuvo la fracción citoplásmica y la presencia de p65 fue detectada por western blot (A) la cantidad de p65, respecto a su control de carga, fue cuantificada por desitometría (B). Se realizaron tres ensayos independientes.

8.4 La inhibición de JAK2 revierte la disminución de p65 en el citoplasma y el incremento en la toxicidad de la Dox inducido por Epo

En células de sistema nervioso, la Epo puede actuar como agente neuroprotector ante la muerte inducida por hipoxia. En este sistema la cinasa JAK2, anclada al EpoR, se encarga de fosforilar residuos de tirosina presentes en I κ B α , lo que promueve la activación de NF- κ B. Por tanto, la activación de este factor de transcripción disminuye cuando las células son tratadas con el inhibidor de JAK2: la tirfostina AG490 (Digicaylioglu *et al.*, 2001). Con estos antecedentes, decidimos estudiar la participación de JAK2 en la activación de NF- κ B mediada por Epo, para ello la cinasa JAK2 fue inhibida farmacológicamente con la tirfostina AG490 y evaluamos la disminución de p65 en el citoplasma inducida por Epo y Dox. De acuerdo a lo previsto, la tirfostina AG490 bloqueó la disminución de p65 en citoplasma inducida por la combinación de Epo y Dox (Figura 7).

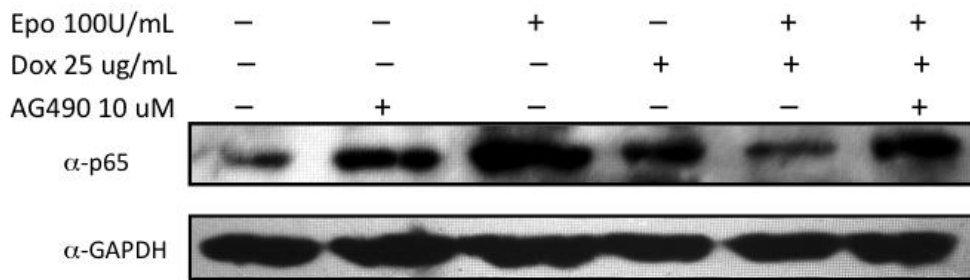


Figura 7. El inhibidor de JAK2, AG490 bloquea la disminución de p65 en citoplasma inducida por Epo y Dox. Las células HeLa fueron preincubadas 1h con AG490 10 uM, posteriormente se agregó la Epo 100 U/mL y se incubó durante 2 h, transcurrido este tiempo se adicionó la DL₅₀ de Dox; 24 h después se extrajo la proteína citoplásmica y p65 fue detectado por western blot. Se realizaron dos ensayos independientes.

El resultado anterior sugiere que la activación de JAK2 está involucrada en la disminución de p65 en citoplasma. Para evaluar si la activación de JAK2 y la disminución de p65 estaban vinculados con el incremento en la actividad citotóxica de la Dox, decidimos evaluar la viabilidad celular en presencia de la tirfostina AG490. El grupo empleado como control no recibió ningún tratamiento, los siguientes tres grupos recibieron los estímulos por separado: AG490, Epo y Dox; la combinación de Epo/AG490 y de Dox/AG490, como se esperaba, no modificó la viabilidad celular; la combinación de Epo/Dox disminuyó la viabilidad celular en comparación con el grupo que sólo recibió el fármaco, pero en el grupo tratado con AG490/Epo/Dox observamos una modesta pero clara tendencia a incrementar viabilidad celular en comparación con el grupo que tratado con Epo/Dox (Figura 7). Esta observación implica que la activación de JAK2 y la disminución de p65 juegan un papel importante en el incremento de la citotoxicidad de la Dox.

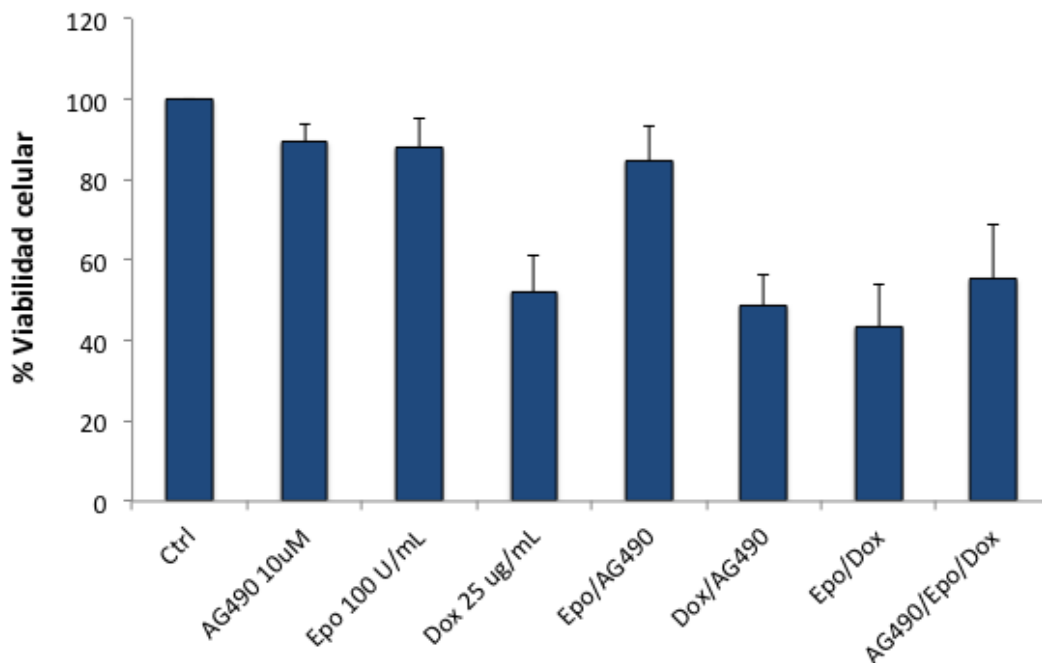


Figura 8. La inhibición de JAK2 disminuye el efecto citotóxico de la Epo y Dox. Las células HeLa fueron preincubadas durante 1 h con AG490 10 uM, posteriormente se agregaron 100 U/mL de Epo y se incubó nuevamente por 2 h, transcurrido este tiempo se adicionó la DL₅₀ de Dox (25 ug/mL). Pasadas 24 h se realizó un ensayo de MTT, para determinar la viabilidad celular. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes.

8.5 La combinación de Epo y Dox incrementa la unión de NF-κB a su secuencia blanco

La disminución de p65 en citoplasma, observada por western blot, sugiere que NF-κB es activado por Epo y Dox, sin embargo, estos ensayos no nos permiten determinar de manera directa si NF-κB es capaz de unirse a su secuencia blanco en el núcleo. Para evaluar lo anterior, realizamos un ensayo de unión a DNA. Elegimos tres períodos de estimulación basándonos en nuestras observaciones y en antecedentes hallados en la literatura, los tiempos de estimulación fueron los siguientes: 0.5, 3 y 24 h.

El resultado de este ensayo muestra que cuando las células son preincubadas 2 h con Epo y posteriormente estimuladas durante 0.5 h con Dox, la cantidad de NF-κB capaz de unirse a su secuencia blanco, incrementa en

comparación con las células control y aquellas que sólo reciben el estímulo con el fármaco (Figura 9). Sorpresivamente, el incremento en la capacidad de NF- κ B de unirse a DNA observado por la combinación de Epo y Dox durante los primeros 30 min posteriores al estímulo con Dox, no persiste 3 h después del estímulo con el fármaco y a las 24 h no es posible detectar a NF- κ B capaz de unirse DNA, a pesar de que los niveles de p65 en el citoplasma detectados por WB son muy bajos. A manera de control se empleó un oligonucleótido mutado que fue incubado con los extractos nucleares de las células estimuladas con Epo y Dox por los períodos señalados.

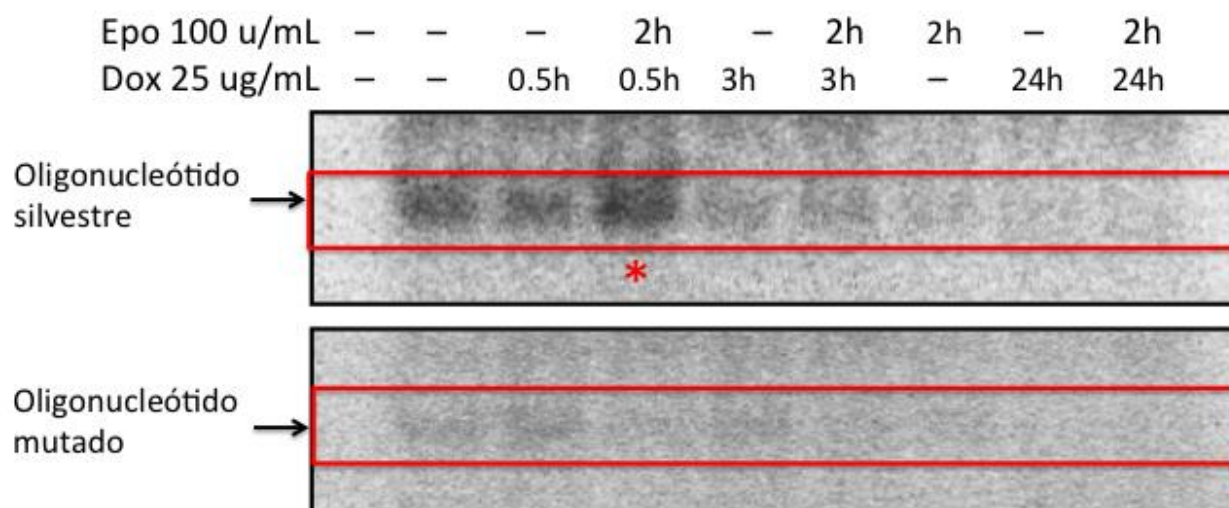


Figura 9. La combinación de Epo y Dox incrementa la cantidad de p65 capaz de unirse a su secuencia blanco. Se incubó con Epo por 2 h y posteriormente, sin remover la hormona, se agregó la Dox por el periodo de tiempo señalado. Se realizó el fraccionamiento citoplasma-núcleo. Una fracción de la proteína nuclear se incubó con el oligonucleótido silvestre que es reconocido por NF- κ B, la segunda fracción nuclear fue incubada con un oligonucleótido mutante que no debe ser reconocido por NF- κ B. El asterisco señala el tratamiento Epo (2h)/Dox (0.5h), condición en la que observamos la mayor cantidad de NF- κ B unido a su elemento de respuesta. Para este experimento se realizó un sólo ensayo.

9. Discusión

El principal mecanismo descrito para la Dox es la capacidad de intercalarse en el DNA y promover la estabilización del complejo formado por la topoisomerasa II y las hebras rotas de DNA, lo que lleva a la disminución de la enzima; además, este fármaco es capaz de desencadenar la producción de radicales libres que dañan al DNA, proteínas y membranas (Hurley *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha descrito que la activación del factor de transcripción NF- κ B es necesaria para que el fármaco ejerza sus efectos citotóxicos, el mecanismo por el cual la Dox es capaz de inducir la activación de este factor de transcripción no es del todo claro, aunque se ha reportado que fibroblastos embrionarios de ratones p65^{-/-} son resistentes a la muerte inducida por Dox (Ryan *et al.*, 2000).

Varios estudios indican que cuando NF- κ B es inducido por TNF- α actúa como factor antiapoptótico, pero cuando es activado por tratamientos citotóxicos como la Dox, Daunorrubicina y la luz UV, es capaz de actuar como un factor de transcripción proapoptótico (Ryan *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2004). Durante este trabajo observamos que la Epo incrementa la citotoxicidad de la Dox en células HeLa de CaCu, un primer acercamiento nos indicó que tanto la Epo como la Dox disminuyen la cantidad de p65 en citoplasma, pero la combinación de estos estímulos logra niveles menores de p65 citoplasmático, en comparación con las células que son tratadas con Epo y Dox por separado. La disminución de esta subunidad en el citoplasma sugiere que se transloca al núcleo; hasta el momento se ha documentado ampliamente que la Dox es capaz de inducir la activación de NF- κ B en distintos linajes celulares, sin embargo, la activación de NF- κ B por Epo sólo se ha reportado en neuronas (Digicaylioglu *et al.*, 2001) y en células HeLa (Pajonk F *et al.*, 2004).

Para determinar si la combinación de Epo y Dox inducía la disminución del heterodímero más abundante de la familia de NF- κ B: p65-p50; realizamos ensayos de western blot para p50. A pesar de que la Epo y la Dox son capaces de disminuir la cantidad de p50 en citoplasma, la combinación de ambos estímulos no disminuyó la cantidad de p50 citoplasmático en comparación con la administración de los estímulos por separado. El hecho de que el incremento de la actividad citotóxica de la Dox sólo correlacione con la disminución de p65 en el

citoplasma y no con la de p50, concuerda con reportes que indican que p65, pero no p50, es capaz de actuar como represor transcripcional de genes antiapoptóticos (Campbell *et al.*, 2006). Lo anterior podría explicar por qué la combinación de Epo con Dox incrementa la citotoxicidad del fármaco.

Posteriormente, decidimos determinar la cinética de disminución de p65 en el citoplasma de células HeLa estimuladas únicamente con Epo, sorprendentemente observamos que cuando las células son estimuladas con Epo, p65 disminuye de manera gradual en el tiempo, este decremento continúa hasta 2 h posteriores al estímulo. Lo anterior puede deberse a que de acuerdo con el trabajo Digicaylioglu *et al.*, 2001 la fosforilación por JAK2, en residuos de tirosinas de I κ B α puede observarse hasta 5 horas después del tratamiento con Epo. La fosforilación de estos residuos es más estable comparada con la fosforilación clásica de serinas, por tanto es probable que la disminución sostenida de p65 en células HeLa estimuladas con Epo se deba a la inactivación sostenida del represor I κ B α .

La fosforilación de tirosinas parece ser un evento relativamente frecuente, pues se ha reportado que estímulos como la hipoxia, el peróxido de hidrógeno y el factor de crecimiento nervioso (NGF) fosforilan a la Tyr 42 de I κ B α , lo que resulta en la disociación de NF- κ B y/o en su degradación (Perkins, 2007). Adicionalmente el grupo de Pajonk *et al.*, 2004 demostró que en células HeLa transfectadas con el EpoR, I κ B α inmunoprecipita con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas. Para determinar si JAK2 estaba involucrada en el incremento de toxicidad observado y en la disminución de p65 en citoplasma, la inhibimos farmacológicamente con la tirfostina AG490. El pretratamiento con el inhibidor de JAK2, y posteriormente con Epo y Dox, produjo un modesto incremento en la viabilidad celular, en comparación con las células que sólo recibieron la combinación de Epo y Dox, aunque no fue capaz de restaurar la viabilidad a los niveles observados cuando las células son tratadas únicamente con Dox. Para establecer si el incremento observado en la viabilidad celular estaba vinculado con los niveles de p65 en citoplasma, se detectó la presencia de p65 por western blot en los extractos de las células que fueron preincubadas con la tirfostina AG490. Conforme a lo previsto, la inhibición de JAK2 bloqueó la disminución de p65 en citoplasma producida por la Epo y Dox. Esto sugiere que

la cinasa JAK2 está involucrada en la disminución de p65 en citoplasma, posiblemente a través de la fosforilación de I κ B α , y de manera parcial en el incremento de citotoxicidad observado.

El hecho de que la inhibición de JAK2 no sea capaz de bloquear por completo el incremento en la citotoxicidad observado por la combinación de Epo y Dox, puede deberse a que la dosis de inhibidor empleada no es suficiente para eliminar por completo la actividad de cinasa de JAK2, o bien a que otras vías como las MAPKs, también están involucradas en la activación de NF- κ B (Ryan *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la Epo también es capaz de activar esta última vía.

Por último, para determinar si la disminución de p65 en el citoplasma implicaba su translocación al núcleo y la unión a sus secuencias blanco, realizamos un ensayo de unión a DNA. De acuerdo a lo observado previamente por western blot, la Dox fue capaz de promover la unión de p65 a sus secuencia blanco y la combinación de Epo y Dox produjo una mayor cantidad de NF- κ B unida a su elemento de respuesta. El nivel máximo de unión a DNA se observó 30 minutos después de que se administró la Dox, esta cinética de unión es similar a la descrita por TNF- α . De manera interesante no observamos un incremento de unión a DNA a las 3 h posteriores a la administración de Dox, ni a las 24 h, a pesar de que de acuerdo a los ensayos de western blot, a las 24 h aún hay una pequeña cantidad de p65 en el citoplasma.

Se ha descrito que cuando NF- κ B es activado por JAK2, promueve un aumento en la expresión de los genes antiapoptóticos X-IAP y c-IAP2 (Digicaylioglu *et al.*, 2001), estos genes también son regulados positivamente cuando NF- κ B es activado por TNF- α . Sin embargo, el grupo de de Campbell ha descrito que estímulos como la luz UV y la Daunorrubicina, fármaco de la familia de la Dox, son capaces de promover la unión de NF- κ B a sus secuencias blanco, pero en este caso p65 actúa como un represor de la transcripción. Incluso la combinación de la Daunorrubicina con TNF- α , es capaz de convertir a NF- κ B en un represor transcripcional de genes antiapoptóticos como Bcl-xL (Campbell *et al.*, 2004). Es probable que el estímulo de Epo administrado 2 h previas a la Dox promueva la unión de NF- κ B a los promotores de estos genes y que el estímulo con Dox modifique la actividad de NF- κ B, convirtiéndolo en un represor

transcripcional. Hay evidencias que indican que NF- κ B tiene cierta actividad de represor basal, pues el tratamiento con el inhibidor de las desacetilasas de histonas (HDACs) TSA, promueve un incremento en la expresión de un gen reportero con secuencias κ B en su promotor, además la sobreexpresión de la HDACs lleva a la disminución de la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF- α (Ashburner *et al.*, 2001). Este comportamiento no es exclusivo de NF- κ B, existen ejemplos de otros factores de transcripción, como YY1, que al asociarse con la desacetilasa de histonas 2 (HDAC2) es capaz de actuar como un represor de la transcripción de genes que inicialmente regula de manera positiva (Yang *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha observado que el uso del inhibidor de síntesis de proteínas CHX, en células HeLa, acelera la cinética de degradación de I κ B α inducida por Dox (Bottero *et al.*, 2001). Por tanto, otra posibilidad que explique el incremento en la unión de NF- κ B es que el estímulo con Epo, suministrado 2 h previas a la Dox, inicia el proceso de degradación de I κ B α ; y la adición de Dox acelera la cinética de traslocación de p65. Lo anterior incrementaría la cantidad de NF- κ B capaz de unirse al DNA, y a su vez este aumento de factor de transcripción en el núcleo, podría incrementar la probabilidad de que NF- κ B se una a complejos correpresores.

A pesar de que existe evidencia de que NF- κ B puede actuar como represor o activador transcripcional, el mecanismo que regula la afinidad de NF- κ B por coactivadores o correpresores, no está definido. Es posible que la intensidad del estímulo que promueve su translocación al núcleo, sea la encargada de definir el papel de este factor transcripcional. Por tanto, una mayor cantidad de NF- κ B unido al DNA, inducido por la combinación de estímulos como TNF- α y Daunorrubicina, o en nuestro caso Epo y Dox conducirán a que NF- κ B actúe como un represor de genes antiapoptóticos, pues una mayor cantidad de NF- κ B en el núcleo podría aumentar la probabilidad de que p65 interactúe con complejos represores de la transcripción.

Lo anterior implica que las diferentes asociaciones de NF- κ B determinan el destino de la célula; por lo cual su transactivación está regulada, al menos de manera parcial, por la asociación con proteínas correpresoras como las HDACs. Es importante apuntar que las HDACs sólo modifican los niveles de expresión

de los genes blanco de NF- κ B, no así la cinética de unión a DNA (Ashburner *et al.*, 2001), lo cual coincide con nuestras observaciones y con lo descrito para TNF- α , en ambos casos, el nivel máximo de unión al elemento de respuesta de NF- κ B se da 30 min posterior al estímulo.

Otro evento que podría explicar el incremento de la citotoxicidad de Dox conferido por la Epo, es la capacidad de esta hormona para activar la vía de las MAPKs. Existe evidencia que indica que la activación de NF- κ B es dependiente de la vía de las MAPKs; específicamente se ha descrito que la cinasa pp90^{rsk}, activada por MEK1, puede fosforilar al inhibidor I κ B α y con ello promover la activación de NF- κ B. Esta vía atípica se ha relacionado con la activación de p53 y la muerte celular por apoptosis (Ryan *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que la inhibición de MEK produce una disminución en la muerte por inducida por p53 en la línea celular de eritroleucemia FVP (Brown *et al.*, 2006).

Adicional a las opciones anteriores, el trabajo de Bottero V *et al.*, 2001 demostró que en células HeLa, la Dox es capaz de inducir la activación de NF- κ B y a su vez esto conduce a la activación de la caspasa 9; la actividad de esta enzima disminuye de manera significativa en presencia del represor I κ B α mutado resistente a la fosforilación. De manera similar, se ha observado que en células endoteliales la inhibición de NF- κ B, con el péptido SN50, lleva a la disminución de la actividad de caspasa 3 inducida por Dox. El incremento en la actividad de caspasa 3 y caspasa 9 inducido por Dox coincide con observaciones previas de nuestro laboratorio (Rojas, 2010). Es probable que en nuestro modelo, el incremento en la actividad de estas enzimas, también esté modulado por la translocación de NF- κ B al núcleo.

La visión de NF- κ B como un factor bifásico es relativamente reciente, no obstante la cantidad de evidencias, que indican que este factor de transcripción puede promover efectos opuestos en un mismo linaje celular, pero bajo estímulos diferentes, cada vez es mayor. El papel dual de este factor debe ser empleado para mejorar la eficacia terapéutica de fármacos cuyo mecanismo citotóxico es dependiente de NF- κ B. Pues, es importante hacer notar que no todos los estímulos citotóxicos inducen la actividad propapoptótica de NF- κ B, agentes genotóxicos como el etopósido, promueven la transcripción de genes antiapoptóticos como Bcl-xL y X-IAP (Campbell *et al.*, 2006).

El mecanismo mediante el cual la unión de NF- κ B, a su elemento de respuesta, está vinculada con el incremento de la actividad citotóxica de Dox cuando se combina con Epo, permanece sin aclararse, aunque podría estar vinculado a al menos a tres eventos 1) NF- κ B, podría estar reclutando proteínas correpressoras y de este modo inhibir genes antiapoptóticos como Bcl-xL, X-IAP y A20; 2) podría estar actuando como un activador transcripcional de p53 (Perkins, 2007); y 3) NF- κ B probablemente actúa como regulador positivo de la actividad de las caspasas 3 y 9 (Bottero *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Para evaluar el mecanismo de manera más detallada, se requieren experimentos adicionales que nos ayuden a corroborar o descartar las propuestas planteadas.

Finalmente, el uso de la Dox en la clínica como agente antitumoral continua vigente, de hecho se han implementado estrategias, como la Dox embebida partículas liposolubles, que han demostrado tener una menor citotoxicidad y una mejor entrega al tumor. Aunque, no se debe pasar por alto, que la principal contraindicación para el uso de la Dox es la cardiotoxicidad que produce (Octavia *et al.*, 2012), pero se ha documentado ampliamente que la Epo es un factor cardioprotector. Por tanto, si la Epo es capaz de incrementar la citotoxicidad de la Dox en células tumorales y además protege a las células cardíacas, la combinación de Epo y Dox, resultaría una propuesta interesante en el tratamiento de CaCu. Por ello, es importante continuar con el estudio de estrategias terapéuticas que permitan mejorar la respuesta al tratamiento y a su vez disminuyan la toxicidad.

10. Conclusiones

- La Epo incrementa el efecto citotóxico de la Dox.
- La Epo no es citotóxica a las dosis empleadas en células HeLa.
- La Epo y la Dox son capaces de disminuir los niveles de p65 y p50 en el citoplasma.
- La combinación de Epo con Dox, produce una disminución pronunciada de p65 en el citoplasma en comparación con las células que reciben los tratamientos por separado.
- La Epo es capaz de inducir una disminución gradual y sostenida de p65 en citoplasma.
- El tratamiento con AG490, inhibe la disminución de p65 provocada por la combinación de Epo y Dox.
- La inhibición de JAK2 con AG490 bloquea el incremento en la citotoxicidad de la Dox, promovido por Epo.
- La combinación de Epo y Dox incrementa la cantidad de NF- κ B capaz de unirse a su secuencia blanco.

11. Apéndice

I. Inactivación del suero fetal bovino (SFB).

Para inactivar el SFB, se incubó durante 30min a 56°C, posteriormente fue almacenado a 4°C.

II. Amortiguador de fosfatos (PBS).

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

III. Solución de MTT

El MTT (Sigma Aldrich) fue disuelto en PBS, pH 7.2 a una concentración de 0.5 mg/mL, se esterilizó por filtración y fue almacenado a 4 °C protegido de la luz.

IV. Amortiguador hipotónico para extraer la fracción citoplásmica**

HEPES pH 7.9,	10 mM
KCL	10 mM
MgCl ₂	1.5 mM
DTT*	1.0 mM

Mezcla de inhibidores de proteasas 25X (Complete-Roche)

*El DTT debe mantenerse a -20°C y se agrega justo antes de utilizar el amortiguador.

**Almacenar a 4°C

V. Amortiguador con detergente NP-40**

NaCl	150 mM
Tris-HCl (pH 8.8)	50 mM
NP40	1 %
DTT*	1.0 mM

Mezcla de inhibidores de proteasas 25X (Complete-Roche)

*El DTT debe mantenerse a -20 °C y se agrega justo antes de utilizar el buffer.

**Almacenar el amortiguador a 4 °C

VI. Amortiguador para preparar el gel apilador de proteínas

Tris-Básico 12 g

Llevar a 200 mL con agua destilada

Ajustar a pH 6.8

*Esterilizar el amortiguador en autoclave.

VII. Amortiguador para preparar el gel separador de proteínas

Tris-HCl 9 g

Tris-Básico 29.4 g

Llevar a 200 mL con agua destilada

Ajustar a pH 8.8

*Esterilizar el amortiguador en autoclave.

VIII. Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Soluciones	Gel separador 10 %	Gel apilador 5 %
Acilamida 30%/ Bisacilamida 0.8%	2.5 mL	0.6225 mL
Amortiguador gel separador	1.875 mL	-----
Amortiguador gel apilador	-----	0.9375 mL
H ₂ O	3 mL	2.1 mL
SDS 10%	75 uL	35 uL
APS 10% *	75 uL	35 uL
TEMED	6 uL	7.5 uL

*El persulfato de amonio (APS) debe prepararse justo antes de hacer los geles o alicuotarlo y mantenerlo a 4 °C, a esta temperatura la estabilidad es de una semana.

IX. Amortiguador de corrida de proteínas 5X (Sistema húmedo)

Tris-básico 15.1 g

Glicina 94 g

SDS 5 g ó 50 mL de SDS al 10%.

* Usar cubrebocas para pesar el SDS y agregar al final.

X. Amortiguador de transferencia de proteínas 10X (Sistema húmedo)

Tris-Hcl	10.93 g
Glicina	90 g
Metanol	10% (Agregar justo antes de utilizar el amortiguador)

Llevar a 1 L con agua destilada

XI. Amortiguador TBS (1X)

Tris-básico	6.5 g
NaCl	8.7 g

Llevar a 1 L con agua destilada

Ajustar a pH 7.6

*Para la solución de bloqueo y lavado se agregó 0.05% de detergente Tween.

XII. Solución de bloqueo

Leche en polvo baja en grasas 2.5 g
Llevar a 50 mL con TBS-Tween al 0.05%

XIII. Solución de dilución de anticuerpo

Leche en polvo baja en grasas	0.5 g
EDTA	1 mM

Llevar a 50 mL con TBS-Tween al 0.05%

*Adicionar el anticuerpo indicado a la dilución apropiada.

XIV. Solución de eliminación de anticuerpo

β -mercaptoetanol	700 μ L
Tris 1M pH 6.8	6.25 mL
SDS 10%	20 mL

Llevar a 100 mL con H₂O

XV. Tirfostina AG490

Se reconstituyó en 1 mL de etanol grado biología molecular y se almacenó a -20 °C protegida de la luz.

Para el ensayo de inhibición la tirfostina se usó a 10 uM y fue disuelta en medio DMEM suplementado con 2% SFB-Inactivado.

12. Referencias

Aapro M, Jelkmann W, Constantinescu SN, Leyland-Jones B. «Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer.» *Br J Cancer* 106, nº 7 (2012): 1249-1258.

Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. «Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer.» *Cancer Res* 61, nº 9 (2001): 3561-3565.

Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. «Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression.» *Am J Pathol* 162, nº 6 (2003): 1789-1806.

Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS. «The p65 (RelA) Subunit of NF- κ B Interacts with the Histone Deacetylase (HDAC) Corepressors HDAC1 and HDAC2 To Negatively Regulate Gene Expression.» *Mol Cell Biol* 21, nº 20 (2001): 7065-7077.

Baeuerle PA, Baltimore D. «NF-kappa B: ten years after.» *Cell* 87, nº 1 (1996): 13-20.

Barón González M, Herrero Camps C, Gascón Villaplana P, López Vega JM, Moreno Nogueira JA, Ordoñez Gallego A, Sánchez Calzado JA, Valentín Maganto V. *Anemia y cáncer*. Editado por Barón González. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2005.

Baseman JG, Koutsky LA. «The epidemiology of human papillomavirus infections.» *J Clin Virol* 32S (2005): s16-s24.

Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. «Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival.» *Lab Invest* 83 (2003): 1477-1487.

Beck I, Weinmann R, Caro J. «Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-Kd nuclear DNA-binding protein in erythropoietin-producing and nonproducing cells.» *Blood* 82, nº 3 (1993): 704-711.

Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. «Expression of the erythropoietin gene.» *Mol Cell Biol* 6, nº 7 (1986): 2571-2575.

Bittorf T, Jaster R, Brock J. «Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3.» *Cell Signal* 6, nº 3 (1994): 305-311.

Blohmer JU, Paepke S, Sehoul J, Boehmer D, Kolben M, Würschmidt F, Petry KU, Kimmig R, Elling D, Thomssen C, von Minckwitz G, Möbus V, Hinke A, Kümmel S, Budach V, Lichtenegger W, Schmid P. «Randomized phase III trial of sequential adjuvant chemoradiotherapy with or without erythropoietin Alfa in patients with high-risk cervical cancer: results of the NOGGO-AGO intergroup study.» *J Clin Oncol* 29, nº 28 (2011): 3791-3797.

Blumberg N, Heal J, Chuang C, Murphy P, Agarwal M. «Further evidence supporting a cause and effect relationship between blood transfusion and earlier cancer recurrence.» *Ann Surg* 207, nº 4 (1988): 410-415.

Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, Zwahlen M, Clarke M, Weingart O, Kluge S, Piper M, Rades D, Steensma DP, Djulbegovic B, Fey MF, Ray-Coquard I, Machtay M, Moebus V, Thomas G, Untch M, Schumacher M, Egger M, Engert A. «Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials.» *Lancet* 373, n° 9674 (2009): 1532-1542.

Bosh FX, De Sanjose S. «Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality.» *J Natl Cancer Inst Monogra* 313 (2003): 3-13.

Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. «Activation of Nuclear Factor κ B through the IKK Complex by the Topoisomerase Poisons SN38 and Doxorubicin : A Brake to Apoptosis in HeLa Human Carcinoma Cells.» *Cancer Res* 61 (2001): 7785-7791.

Brown L, Benchimol S. «The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation. Cell cycle or apoptosis.» *The J Bioll Chem* 281, n° 7 (2006): 3832-40.

Bush RS. «The significance of anemia in clinical radiation therapy.» *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, n° 11 (1986): 2047-2050.

Caamaño J, Hunter CA. «NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions.» *Clin Microbiol Rev* 15, n° 3 (2002): 414-429.

Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. «Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kB.» *Mol Cell* n° 13 (2004): 853-865.

Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, Perkins ND. «Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of Rel A (p65) nuclear factor-kappaB transactivation. .» *Cancer Res* n° 66 (2006): 929-935.

Candelaria M, Cetina L, Dueñas-González A. «Anemia in cervical cancer patients: implications for iron supplementation therapy.» *Med Oncol* 22, n° 2 (2005): 161-168.

Caramelo C, Justoa S, Gilb P. «Anemia in Heart Failure: Pathophysiology, Pathogenesis, Treatment and Cognitae.» *Rev Esp Cardiol* 60 (2007): 848-860.

Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. «Anemia as an independent prognostic factor for survival patients with cancer: a systemic, quantitative review.» *Cancer* 91, n° 12 (2001): 2214-2221.

Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. «Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines.» *Cancer Res* 57, n° 10 (1997): 1946-1954.

Chen JR, Yang YC, Chen TC, Lai JC, Chang SJ, Chang CL, Wang KL. «Salvage chemotherapy in recurrent cervical cancer with biweekly pegylated liposomal Doxorubicin (lipo-dox).» *Taiwan J Obstet Gynecol* 47, n° 3 (2008): 322-326.

Cumming PD, Wallace EL, Schorr JB, Dodd RY. «Exposure of patients to human immunodeficiency virus through the transfusion of blood components that test antibody-negative.» *N Engl J Med* 321, n° 14 (1989): 941-946.

Damen JE, Cutler RL, Jiao H, Yi T, Krystal G. «Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity.» *J Biol Chem* n° 40 (1995): 23402-23408.

de Bree E, Theodoropoulos PA, Rosing H, Michalakis J, Romanos J, Beijnen JH, Tsiftsis DD. «Treatment of ovarian cancer using intraperitoneal chemotherapy with taxanes: from laboratory bench to bedside.» *Cancer Treat Rev* 32, n° 6 (2006): 471-482.

Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill BT, Schmoll HJ. «Cisplatin resistance and oncogenes-a review.» *Anticancer Drugs* 11, n° 4 (2000): 225-236.

Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. «Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin.» *Cell Mol Life Sci* 59, n° 11 (2002): 1914-1927.

Digicaylioglu M, Lipton SA. «Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades.» *Nature* 412, n° 6847 (2001): 641-647.

Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr, Reitz BA, Nelson KE. «The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection.» *N Engl J Med* 327, n° 6 (1992): 369-373.

Dowdy SC, Boardman CH, Wilson TO, Podratz KC, Hartmann LC, Long HJ. «Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer.» *Am J Obstet Gynecol* 186, n° 6 (2002): 1167-1173.

du Bois A, Pfisterer J, Burchardi N, Loibl S, Huober J, Wimberger P, Burges A, Stähle A, Jackisch C, Kölbl H. «Combination therapy with pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin in gynecologic malignancies: a prospective phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and Kommission Uterus (AGO-K-Ut).» *Gynecol Oncol* 107, n° 3 (2007): 518-525.

Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fischer S, Mayeux P. «Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells.» *J Biol Chem* 267, n° 15 (1992): 10670-10675.

Dusanter-Fourt I, Muller O, Ziemiecki A, Mayeux P, Drucker B, Djiane J, Wilks A, Harpur AG, Fischer S, Gisselbrecht S. «Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. .» *EMBO J* 13, n° 11 (1994): 2583-2591.

Ebert BL, Bunn HF. «Regulation of the erythropoietin gene.» *Blood* 94, n° 6 (1999): 1864-1867.

Eifel PJ, Burke TW, Delclos L, Wharton JT, Oswald MJ. «Early stage I adenocarcinoma of the uterine cervix: treatment results in patients with tumors less than or equal to 4 cm in diameter. .» *Gynecol Oncol* 41, n° 3 (1991): 199-205.

Eifel PJ, Winter K, Morris M, Levenback C, Grigsby PW, Cooper J, Rotman M, Gershenson D, Mutch DG. «Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: an update of radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01.» *J Clin Oncol* 22, n° 5 (2004): 872-880.

Eisenkop SM, Spirtos NM, Montag TW, Moossazadeh J, Warren P, Hendrickson M. «The clinical significance of blood transfusion at the time of radical hysterectomy.» *Obstet Gynecol* 76, n° 1 (1990): 110-113.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Mei Qi Y, Hengst K, McMillan NAJ. «Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. .» *J Virol*, n° 71 (1997): 2449–2456 .

Evans JC, Bergsjö P. «The influence of anemia on the results of radiotherapy in carcinoma of the cervix.» *Radiology* 84 (1965): 709-717.

Fairbanks LD, Rückemann K, Qiu Y, Hawrylowicz CM, Richards DF, Swaminathan R, Kirschbaum B, Simmonds HA. «Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis?» *Biochem J* 15, n° 342 (1999): 143-152.

Farrel F, Lee A. «The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues.» *Oncologist* 9 (2004): 18-30.

Frommhold H, Guttenberger R, Henke M. «The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience.» 174, n° Suppl 4 (1998): 31-34.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. «NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.» *Annu Rev Immunol* 16 (1998): 225-260.

Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C, Malaise EP, Haie C, Gerbaulet A, Chassagne D. «Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: results of a retrospective study of 386 patients.» *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16, n° 1 (1989): 37-42.

GLOBOCAN. Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Ferlay J. 2008. <http://globocan.iarc.fr> (último acceso: marzo de 2013).

Grau C, Overgaard J. «Significance of hemoglobin concentrations for treatment outcome.» En *Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Implications for clinical radiooncology.*, de Vaupel P, editors. Molls M, 101-112. Berlin: Spriger, 1998.

Grigsby PW, Herzog TJ. «Current management of patients with invasive cervical carcinoma.» *Clin Obstet Gynecol* 44, n° 3 (2001): 531-537.

Gupta S, Singh PK, Bisth SS, Bhatt ML, Pant M, Gupta R, Singh S, Negi MP. «Role of recombinant human erythropoietin in patients of advanced cervical cancer treated "by chemoradiotherapy".» *Cancer Biol* 8, n° 1 (2009): 13-17.

Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. «Erythropoietin biology in cancer.» *Clin Cancer Res* 12, n° 2 (2006): 332-339.

Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. «Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial.» *Lancet* 362, n° 9392 (2003): 1255-1260.

Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. «Pathophysiology of anemia and erythrocytosis.» *Crit Rev Oncol Hematol* 64, n° 2 (2007): 139-158.

Hortobágyi GN. «Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview.» *Drugs* 54, nº 4 (1997): 41-47.

Hurley, Laurence H. «DNA and its associated processes as targets for cancer chemotherapy.» *Nature Reviews Cancer* 2, nº 3 (2002): 188-200.

Jackson RC, Grindey GB. *The biochemical basis for methotrexate cytotoxicity*. Vol. 1, de *Folate antagonist as therapeutic agents*, de Burchall JJ, Ensminger WD, Montgomery JA, Sirotnak FM, 289-315. Orlando, Florida: Academic Press, 1984.

Jamieson ER, Lippard SJ. «Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts.» *Chem Rev* 99, nº 9 (1999): 2467-2498.

Jelkmann W. «Erythropoietin: structure, control of production, and function.» *Physiol Rev* 72, nº 2 (1992): 449-489.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT. «The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes.» *J Biol Chem*, nº 274 (1999): 5810-5822.

Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE. «Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariable analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival.» *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 9, nº 4 (1983): 445-455.

Kelland L. «The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.» *Nat Rev Cancer* 7, nº 8 (2007): 573-584.

Kim TE, Park BJ, Kwack HS, Kwon JY, Kim JH, Yoon SC. «Outcomes and prognostic factors of cervical cancer after concurrent chemoradiation.» *J Obstet Gynaecol Res.*, 2012.

Kinlen LJ, Sprigs AI. «Women with positive cervical smears but without surgical intervention. A follow up study.» *Lancet* 2, nº 8087 (1978): 463-465.

Kitagawa R, Katsumata N, Ando M, Shimizu C, Fujiwara Y, Yoshikawa H, Satoh T, Nakanishi T, Ushijima K, Kamura T. «A multi-institutional phase II trial of paclitaxel and carboplatin in the treatment of advanced or recurrent cervical cancer.» *Gynecol Oncol* 125, nº 2 (2012): 307-311.

Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. «Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals.» 80, nº 5 (1995): 729-738.

Koury MJ, Bondurant MC. «Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells.» *Science* 248, nº 4953 (1990): 378-381.

Kuo DY, Blank SV, Christos PJ, Kim M, Caputo TA, Pothuri B, Hershman D, Goldman N, Ivy PS, Runowicz CD, Muggia F, Goldberg GL, Einstein MH. «Paclitaxel plus oxaliplatin for recurrent or metastatic cervical cancer: a New York Cancer Consortium Study.» *Gynecol Oncol* 116, nº 3 (2010): 442-446.

Lacombe C, Mayeux P. «The molecular biology of erythropoietin.» *Nephrol Dial Transplant* 14, nº Suppl 2 (1999): 22-28.

Landoni F, Maneo A, Colomb A. «Randomized study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. » *Lancet*, nº 350 (1997): 535-540.

Landoni F, Maneo A, Cormio G. «Class II versus Class III radical hysterectomy in Stage IB-IIA cervical cancer: A prospective randomized study 1,2. » *Gynecol Oncol* nº 80 (2001): 3-12.

Lavey RS, Liu PY, Greer BE, Robinson WR 3rd, Chang PC, Wynn RB, Conrad ME, Jiang C, Markman M, Alberts DS. «Recombinant human erythropoietin as an adjunct to radiation therapy and cisplatin for stage IIB-IVA carcinoma of the cervix: a Southwest Oncology Group study.» *Gynecol Oncol* 95, nº 1 (2004): 145-151.

Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Höckel M. «Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis.» *Clin Cancer Res* 12, nº 23 (2006): 6894-6900.

Leyland-Jones B, y BEST Investigators and Study Group. «Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly.» *Lancet Oncol* 4, nº 8 (2003): 459-460.

Li B, Dou QP. «Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. .» *Proc Natl Acad Sci* 97 (2000): 3850-3855.

Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercaemmen E, Rapoport B, y Epoetin Alfa Study Group. «Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.» *J Clin Oncol* 19, nº 11 (2001): 2865-2874.

Littlewood TJ, Nortier J, Rapoport B, Pawlicki M, de Wasch G, Vercaemmen E, Schuette W, Wils J, Freund M, y Epoetin Alfa Study Group. «Epoetin alfa corrects anemia and improves quality of life in patients with hematologic malignancies receiving non-platinum chemotherapy.» *Hematol Oncol* 21, nº 4 (2003): 169-180.

Lopez TV, Lappin TR, Maxwell P, Shi Z, Lopez-Marure R, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L. «Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells.» *Int J Cancer* 129, nº 11 (2011): 2566-2576.

Lopez-Bojorquez LN. «Papel de las isoformas de la proteína inhibidora IKBa en la activación del factor de transcripción NF-kB.» *REB* 23, nº 4 (2004): 140-148.

López MA, Ustarez E. « Dosis altas de eritropoyetina β semanal en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en remisión, que reciben quimioterapia; efecto en sus requerimientos transfusionales.» *Med Int Mex* 24, nº 6 (2008): 375-380.

Madison. «Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis.» *J Invest Dermatol*, nº 121 (2003): 231-241.

Meynard D, Le Morvan V, Bonnet J, Robert J. «Functional analysis of the gene expression profiles of colorectal cancer cell lines in relation to oxaliplatin and cisplatin cytotoxicity.» *Oncol Rep* 17, nº 5 (2007): 1213-1221.

Micetich KC, Barnes D, Erickson LC. «A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) and cis-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells.» *Cancer Res* 45, nº 9 (1985): 4043-4047.

Misset JL. «Oxaliplatin in practice.» *Br J Cancer* 77, nº 4 (1998).

Moynagh PN. «The NF-kappaB pathway.» *J Cell Sci* 118 (2005): 4589-4592.

Müller CW, Harrison SC. «The structure of the NF-kappa B p50:DNA-complex: a starting point for analyzing the Rel family.» *FEBS Lett* 369, nº 1 (1995): 113-117.

Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel, Oren M, Krammer PH. «53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.» *J Exp Med* 188, nº 11 (1998): 2033-2045.

Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M,. «Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 protein.» *Oncogene*, nº 20 (2001): 7888-7980.

Muñoz N, Castellsagué, Berrington de González A, Gissmann L. «Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer.» *Vaccine* 24, nº 3 (2006): S1-S10.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS. «Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.» *Lancet* 359, nº 9312 (2002): 1093-1101.

Nohl, H. «Demonstration of the existence of an organo-specific NADH dehydrogenase in heart mitochondria.» *Eur J Biochem* 169, nº 3 (1987): 585-591.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. «Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies.» *J Mol Cell Cardiol* 52, nº 6 (2012): 1213-1225.

Oliver FJ, Collins MK, López-Rivas A. «dNTP pools imbalance as a signal to initiate apoptosis.» *Experientia* 52, nº 10-11 (1996): 995-100.

OMS. *Organización Mundial de la Salud*. 23 de Mayo de 2012. <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en/#> (último acceso: 23 de Mayo de 2012).

Pajonk F, Weil A, Sommer A, Suwinski R, Henke M. «The erythropoietin-receptor pathway modulates survival of cancer cells.» *Oncogene* 23, nº 55 (2004): 8987-8991.

Pedersen D, Søgaaard H, Overgaard J, Bentzen SM. «Prognostic value of pretreatment factors in patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy alone.» *Acta Oncol* 34, nº 6 (1995): 787-795.

Perkins, ND. «Integrating cell-signalling pathways with NF-kB and IKK function.» *Nature Rev Mol Cell Biol* 8 (2007): 49-62.

Petersen O. «Spontaneous course of cervical precancerous conditions.» *Am J Obstet Gynecol* 72, nº 5 (1956): 1063-1071.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich- Pyest E, Urieli- Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. «NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation- associated cancer.» *Nature* 431, nº 7007 (2004): 461-466.

Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. «Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies.» *Ann Oncol* 9, nº 10 (1998): 1053-1071.

Remy I, Wilson IA, Michnick SW. «Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change.» *Science* 283, nº 5404 (1999): 990-993.

Riccardi R, Riccardi A, Di Rocco C, Carelli G, Tartaglia RL, Lasorella A, Servidei T, Mastrangelo R. «Cerebrospinal fluid pharmacokinetics of carboplatin in children with brain tumors.» *Cancer Chemother Pharmacol* 30, nº 1 (1992): 21-24.

Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, Seidenfeld J, Bohlius J, Bennett CL, Cella DF, Djulbegovic B, Goode MJ, Jakubowski AA, Rarick MU, Regan DH, Lichtin AE. «Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update.» *Blood* 111, nº 1 (2008): 25-41.

Rojas I. «Efecto de la eritropoyetina en la muerte celular inducida por quimiofármacos empleados en el tratamiento de cáncer cervicouterino.» *Tesis de licenciatura*. México,DF, 2010.

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. «Inhibition of cell division in escherchia coli by electrolysis products from a platinum electrode.» *Nature* 13, nº 205 (1965): 698-699.

Rudofsky G Jr, Reismann P, Schiekofer S, Petrov D, Eynatten M, Humpert PM, Isermann B, Müller-Hoff C, Thai TP, Lichtenstein S, Bärtsch U, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A. «Reduction of postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes reduces NF-kappaB activation in PBMCs.» *Horm Metab Res* 39, nº 9 (2004): 630-638.

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. «Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death.» *Nature* 404, nº 6780 (2000): 892-897.

Sladek NE. «Metabolism of oxazaphosphorines.» *Pharmacol Ther* 37, nº 3 (1988): 301-355.

Seongeun L, Myungin B, Hae-Yeong K, Ji-Hong H, Doo-II J. «Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis.» *Biotech Lett* 24, nº 14 (2002): 1147-1151.

Shander A, Javidroozi M, Ozawa S, Hare GM. «What is really dangerous: anaemia or transfusion?» *Br J Anaesth* 107, nº 1 (2011): 41-59.

Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. «Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction.» *Cella* 98, nº 2 (1999): 181-191.

Strauss HG, Haensgen G, Dunst J, Hayward CR, Burger HU, Scherhag A, Koelbl H. «Effects of anemia correction with epoetin beta in patients receiving radiochemotherapy for advanced cervical cancer.» *Int J Gynecol Cancer* 18, nº 3 (2008): 515-524.

Szumiel I, Nias AH. «The effect of combined treatment with a platinum complex and ionizing radiation on chinese hamster ovary cells in vitro.» *Br J Cancer* 33, nº 4 (1976): 450-458.

Tao X, Hu W, Ramirez PT, Kavanagh JJ. «Chemotherapy for recurrent and metastatic cervical cancer.» *Gynecol Oncol* 110, n° 3 (2008): S67-S71.

Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee YC, Abulafia O. «Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation.» *Int J Gynecol Cancer* 16, n° 5 (2006): 1855-1861.

Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM. «IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy.» *Mol Cell Biol* 23, n° 22 (2003): 8070-8083.

Thomas M, Banks L. «Inhibition of bak-induced apoptosis by HPV-18 E6.» *Oncogene* 17, 1998: 2943-2954.

Umemura T, Umene K, Takahira H, Takeichi N, Katsuno M, Fukumaki Y, Nishimura J, Sakaki Y, Ibayashi H. «Hematopoietic growth factors (BPA and Epo) induce the expressions of c-myc and c-fos proto-oncogenes in normal human erythroid progenitors.» *Leuk Res* 12, n° 3 (1988): 187-194.

Vázquez-Mellado MJ. «Efecto de la eritropoyetina recombinante humana sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción.» *Tesis de licenciatura*. México, DF, 2009.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. «Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. .» *Pathol J* 189 (1999): 12-19.

Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. «Activation of nuclear factor-κB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide.» *Biochem J* 367 (2002): 729-740.

Wataya Y, Watanabe K, Yoshida S, Hiramoto-Yoshioka A. «dNTP imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death.» *Nucleic Acids Symp Ser*, n° 21 (1989).

Weaver BA, Cleveland DW. «Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death.» *Cancer Cell* 8, n° 1 (2005): 7-12.

WilkesGM. «Potential toxicities and nursing management.» En *Cancer chemotherapy: A nursing procces approach.*, de Wilkes GM, Ingwersen K. Barton M, 97-98. Jones and Bartlett Publishers International, 1996.

Willmott Li, Monk BJ. «Cervical cancer therapy: current, future and anti-angiogenesis targeted treatment.» *Expert Rev Anticancer Ther*, n° 9 (2009): 895-903.

Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. «2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adecarcinoma in stu.» *Am J Obstret Gynecol* 197, n° 4 (2007): 340-345.

Wu H, Klingmüller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. «Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation.» *Proc Natl Acad Sci* 94 (1997): 1806-1810.

Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. «Interactions of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors.» *Nature* 377, n° 6546 (1995): 242-246.

Wun T, Law L, Harvey D, Sieracki B, Scudder SA, Ryu JK. «Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin.» *Cancer* 98, n° 7 (2003): 1514-1520.

Yang, WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D., Seto E. «Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 12845-12850.

Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. «Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis.» *J Biol Chem* 273, n° 39 (1998): 25381-25387.

Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, Wataya Y. «The mechanism of dNTP-unbalanced cell death induced by 5-fluorouracil and its derivatives.» *Nucleic Acids Symp Ser*, n° 16 (1985): 245-248.

Zhang J, Tian Q, Zhu YZ, Xu AL, Zhou SF. «Reversal of resistance to oxazaphosphorines.» *Curr Cancer Drug Targets* 6, n° 5 (2006): 385-407.