

83



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO APOPTOTICO DEL DERIVADO PIRIMIDICO DE UNA
LACTONA SESQUITERPENICA (III JLNZ-106) EN LA LINEA
CELULAR TUMORAL HeLa.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MIGUEL ANGEL MARTINEZ URBINA



MEXICO, D. F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2001

3002 13



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.



Jurado asignado:

| | |
|------------------|------------------------------------|
| Presidente. | Prof. Angelina Quintero Ruiz |
| Vocal | Prof. Marisol Lopez Lopez. |
| Secretario | Prof. Raquel Ortega Muñoz. |
| Primer suplente | Prof. Maria de Lourdes Mayet Cruz. |
| Segundo suplente | Prof. Maria Elena Ibarra Rubio |

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Biología Molecular.

Departamento de biología.

Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor del tema:

Dra. Angelina Quintero Ruiz.

Supervisor técnico:

Q.F.B. José Dolores Solano Becerra.

Sustentante:

Miguel Ángel Martínez Urbina.

DEDICATORIA:

A.: LA.: G.: D.: G.: A.: D.: U.:

A mis padres Gaudencia y Enrique, pues en este mundo a ellos les debo todo.

A Mercedes Caballero, por su cariño, comprensión y ayuda desinteresada durante esta parte de mi vida.

A Angeles por estar conmigo y apoyarme estos últimos años.

A Jesus Gomez por compartir su amistad y cariño.

A mi abuelo Concepción q.e.p.d. por ser un ejemplo de bondad, amor y rectitud para mi.

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A la Dra Angelina Quintero Ruíz por su apoyo y paciencia durante la elaboración de este trabajo.

Al Q.F.B. José Dolores Solano por sus consejos y amistad.

A la Men C Aliesha por su apoyo en la técnica de Western Blot.

A los integrantes del jurado:

Prof. Angelina Quintero.

Prof. Marisol Lopez.

Prof. Raquel Ortega.

Prof. María de Lourdes Mayet.

Prof. María Elena Ibarra.

| CONTENIDO | PAGINA |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 2 |
| 3. HIPÓTESIS | 3 |
| 4. ANTECEDENTES | |
| Cáncer | 4 |
| Causas de cáncer | 5 |
| Carcinogénesis | 9 |
| Mecanismo de iniciación | 11 |
| Mecanismo de promoción | 11 |
| Mecanismo de progresión | 13 |
| La quimioterapia y el cáncer | 14 |
| Taxol | 17 |
| Lactonas sesquiterpénicas | 19 |
| Muerte celular | 20 |
| Señales de muerte extracelulares | 26 |
| Reguladores intracelulares de muerte | 28 |
| Efectores de muerte | 37 |
| ¿Cómo activar una caspasa? | 38 |
| Inhibidores de la apoptosis | 43 |
| Fagocitosis de células apoptóticas | 44 |
| 5 METODOLOGÍA | |
| Mantenimiento de la línea celular HeLa | 45 |
| Exposición al compuesto | 47 |
| Conteo celular | 48 |
| Citometría de flujo | 49 |
| Técnica de TUNEL | 50 |
| Extracción de proteínas | 52 |
| Cuantificación de proteínas | 52 |
| Electroforesis | 53 |

| | |
|--|----|
| Transferencia | 53 |
| Bloqueo e incubación con los anticuerpos | 53 |
| Revelado | 54 |
| 1. PREPARACION DE SOLUCIONES | |
| Medio de cultivo | 55 |
| Medio de congelamiento | 55 |
| Solución de PBS-EDTA | 55 |
| Solución de etanol al 70% | 56 |
| Amortiguador P-C (fosfato-ácido cítrico) | 56 |
| Amortiguador de lisis | 56 |
| Gel al 12% acrilamida-bisacrilamida | 57 |
| Solución de TBS | 57 |
| 2. RESULTADOS | 58 |
| 3. DISCUSIÓN | 70 |
| 4. CONCLUSIONES | 74 |
| 5. REFERENCIAS | 75 |

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad en la cual los mecanismos encargados de regular la proliferación celular están fuera de control, es decir, las células presentan un desorden en el control de su crecimiento y diferenciación. Es un padecimiento multifactorial que puede tener varias causas como la dieta, herencia, hábitos de higiene, medio ambiente y efectos de compuestos químicos.

En México, el cáncer es la segunda causa de muerte, solo después de las enfermedades del corazón. El tratamiento de este padecimiento está basado en la radioterapia y la quimioterapia, la quimioterapia actual tiene como objetivo el uso de fármacos para tratar la enfermedad sin dañar al paciente. La efectividad de la quimioterapia depende de la naturaleza del cáncer, ya que no existe un agente único para todas las neoplasias.

Por lo anterior es necesario encontrar nuevos agentes químicos contra el cáncer que puedan diferenciar entre células normales y neoplásicas. En la actualidad se está buscando que estos compuestos activen directamente la maquinaria apoptótica de la célula, para asegurar que estas células sean fagocitadas sin que exista un daño en el tejido circundante al tumor, producto de una respuesta inflamatoria, pues se ha observado que si las células mueren por apoptosis, la inflamación es suprimida.

La apoptosis es crítica para el desarrollo normal y el mantenimiento de la homeostasis de organismos multicelulares y su desregulación ha sido asociada con padecimientos auto inmunes, desórdenes neurodegenerativos, cáncer y resistencia múltiple a fármacos. La apoptosis puede ser inducida por varios estímulos, incluyendo la privación de factores de crecimiento, la aplicación de fármacos quimioterapéuticos y la inducción de daño al ADN.

Una vez iniciada la apoptosis, en la célula se presentan una serie de características bien definidas, como son el encogimiento celular, la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos.

La apoptosis cuenta con dos fases, una de iniciación y otra de ejecución, estas fases son controladas por una cascada secuencial de activación, por degradación proteolítica, de una familia de cisteín proteasas (caspasas).

La regulación celular de la apoptosis está constituida por la familia de proteínas Bcl-2, la cual incluye a los agonistas de la apoptosis Bax, Bak, Bad, y Bcl-x_l, y a los antagonistas Bcl-2, Bcl-W, Mcl-1 y Bcl-x_L, cuyas interacciones al formar homo y hetero dímeros juegan un papel muy importante en su función.

En el presente trabajo se evaluó el efecto apoptótico del derivado pirimidico de una lactona sesquiterpénica (III JLNZ-106) en la línea celular HeLa (cáncer de cervix). El compuesto fue probado a una concentración de 70µM durante 5, 24 y 48 h de exposición para cuantificar por citometría de flujo el porcentaje de células en fase sub G1 (apoptóticas), obteniéndose los siguientes resultados a las 5 h de exposición al fármaco se pudo cuantificar un 0.10% de células apoptóticas, a las 24 h de exposición un 4.56% de células apoptóticas y a 48 h un 25.00%

Con la finalidad de detectar microscópicamente el efecto apoptótico del compuesto, se utilizó la técnica de TUNEL. Probando el compuesto a una concentración de 70µM durante 5, 24 y 48 h de exposición, se observó que a las 5 h de exposición existían muy pocas células con fluorescencia amarilla, indicativa de apoptosis, sin embargo a 24 h de exposición, el número de células con esta fluorescencia aumentó, y además, se comenzaron a observar cuerpos apoptóticos, a las 48 h de exposición, la fluorescencia fue muy marcada en un gran número de células y también se aumentó drásticamente la cantidad de cuerpos apoptóticos.

Además fue analizada la expresión de BAX en respuesta a la exposición al compuesto (70µM) durante 8, 24 y 48 h y los resultados mostraron un índice BAX actina de 0.8798 a las 8 h, de 0.9042 a las 24 h, de 1.1445 a las 36 h y de 0.8385 a las 48 h respectivamente

2. OBJETIVOS

Objetivo general.- demostrar que el derivado pirimidico de una lactona sesquiterpénica (III JLNZ-106) produce apoptosis en la línea celular tumoral HeLa.

Objetivos particulares

Cuantificar el porcentaje de células HeLa apoptóticas después de varios tiempos de exposición al compuesto y a una sola concentración.

Analizar la expresión de BAX en las células HeLa después del tratamiento a diferentes tiempos de exposición con el compuesto a una sola concentración.

3. HIPÓTESIS

Debido a las características estructurales del compuesto III JLNZ-106, éste podrá causar un daño a las células HeLa que provoque su muerte por apoptosis.

2. OBJETIVOS

Objetivo general - demostrar que el derivado pirimídico de una lactona sesquiterpénica (III JLNZ-106) produce apoptosis en la línea celular tumoral HeLa.

Objetivos particulares

Cuantificar el porcentaje de células HeLa apoptóticas después de varios tiempos de exposición al compuesto y a una sola concentración.

Analizar la expresión de BAX en las células HeLa después del tratamiento a diferentes tiempos de exposición con el compuesto a una sola concentración.

3. HIPÓTESIS

Debido a las características estructurales del compuesto III JLNZ-106, éste podrá causar un daño a las células HeLa que provoque su muerte por apoptosis.

4 ANTECEDENTES.

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad compleja y la carcinogénesis es la transformación de una célula normal a una cancerosa en un proceso que involucra muchas etapas. Clínicamente, el cáncer es un grupo extenso de padecimientos, que varían con la edad a la cual se presenta, rango de crecimiento, estado de diferenciación celular, invasividad, potencial metastásico, respuesta al tratamiento y pronóstico. El cáncer es un padecimiento producto de la expresión alterada de oncogenes y supresores tumorales. Esta expresión anormal ocurre a través de un número de mecanismos, que incluyen un daño directo al ADN (mutaciones génicas, translocaciones o amplificaciones) y una traducción o transcripción anormal de genes (1)

El cáncer puede ocurrir a cualquier edad, pero es usualmente considerado un padecimiento de la edad. En promedio el diagnóstico de los tipos más comunes de cáncer se presenta a la edad de 67 años. Aunque el cáncer es relativamente raro en niños, es silenciosamente, una causa importante de muerte en aquellos entre las edades de 1 a 14 años (1)

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En México, Estados Unidos y un gran número de países europeos, el cáncer es la segunda causa de mortalidad. Cerca de un millón de nuevos casos de cáncer ocurren en los Estados Unidos cada año (1), mientras que en México sólo en las 10 primeras semanas del año 2001 se tenían contabilizados 3, 591 nuevos casos y la mortalidad causada por esta enfermedad en el año de 1997 fue de 51, 254 habitantes (2)

CAUSAS DE CÁNCER

Uso de tabaco

En muchas partes del mundo del 30 al 40% de los cánceres están relacionados con el uso del tabaco. Wynder en los Estados Unidos y Doll en Inglaterra, fueron los primeros en analizar las causas de cáncer en hombres, estos autores descubrieron que cerca del 90% de los cánceres de pulmón estaban asociados con el hábito de fumar (3). En Estados Unidos la cantidad de hombres fumadores ha disminuido en los últimos 20 años y el rango de incidencia de cáncer pulmonar ha comenzado a declinar desde 1988, pero desafortunadamente ahora existen una mayor cantidad de mujeres fumadoras y el cáncer pulmonar asesina a un mayor número de mujeres que el cáncer de mama. Actualmente se ha demostrado que no sólo las personas que fuman tabaco pueden padecer esta enfermedad, sino también quienes lo mastican, este hábito prevalece en la India y otros países del sureste de Asia en donde se ha encontrado una alta incidencia de cáncer de la cavidad oral y el esófago (4). Esto puede ser debido al alto contenido de nitrosaminas que son formadas durante el procesamiento del tabaco.

Uso de alcohol

Fumar y beber alcohol incrementa el riesgo de cáncer en la cavidad oral y especialmente en el esófago. Los licores fuertes inducen este tipo de cánceres mediante un mecanismo en donde el acetaldehído puede estar involucrado (5).

Hábitos alimenticios

En muchas partes del mundo tipos específicos de cánceres están relacionados a las tradiciones nutricionales. Por ejemplo en África el cáncer de hígado está relacionado a la ingesta de comida que contiene aflatoxina B₁. En algunos países como Estados Unidos, Japón, China y Rusia el cáncer de estómago manifestó una alta incidencia y mortalidad hasta antes de 1920 cuando empezó a decrecer (6). Se ha asociado la ocurrencia de este padecimiento con el uso tradicional de sal como procedimiento para la conservación de alimentos antes de la invención de la conservación por refrigeración (6).

Los cánceres ocasionados por hábitos alimenticios más comunes en el mundo, son los cánceres de mama pos-menopausia, colon distal, próstata, páncreas, ovario y endometrio. Las evidencias sugieren que los carcinógenos genotóxicos para muchos de estos padecimientos, provienen de la ingesta tradicional de comidas fritas y hervidas tales como las carnes (7). La superficie de estos alimentos contiene una nueva clase de poderosos mutágenos, como las aminas heterocíclicas que son carcinógenas en modelos animales (7).

Hormonas

La exposición hormonal parece jugar un papel en la susceptibilidad de la mujer para desarrollar cáncer de mama. Los efectos carcinogénicos de las hormonas fueron primeramente demostrados en animales, cuando en 1932 se reportó la inducción de carcinomas mamarios en ratones inyectados repetidamente con extractos de ovario que contenían estrógenos. Después también se demostró lo mismo con un estrógeno sintético llamado dietilestilbestrol (8).

En humanos el papel de las hormonas en el desarrollo de cáncer de mama ha sido deducido de varios factores de riesgo asociados con el padecimiento. Estos factores de riesgo incluyen una temprana edad de la menarquia, una edad retardada del primer embarazo y una menopausia retardada, sugiriendo que una larga duración de exposición a una estimulación hormonal es un agente etiológico en el cáncer de mama (9).

Químicos industriales

Cerca del 2 al 4% de todas las muertes por cáncer son atribuidas a riesgos ocupacionales (10). De todas aquellas sustancias consideradas como carcinogénicas para los humanos, un gran número fueron identificadas por su estrecha asociación entre un agrupamiento anormal de ciertos cánceres y la exposición a un agente químico o a un proceso industrial. Por ejemplo, estudios epidemiológicos de trabajadores expuestos ocupacionalmente a niveles industriales de 4-aminobifenilo, muestran que ellos tienen una gran incidencia de cáncer de vejiga (11). También la exposición ocupacional a fibras de asbesto resulta en una alta incidencia de cáncer de pulmón, cáncer del tracto gastrointestinal y de laringe. La exposición ocupacional a hollín, alquitrán, brea, humo de carbón y algunos aceites está asociada con cánceres de la piel, pulmón, vejiga y tracto gastrointestinal. La carcinogenicidad de esos agentes está probablemente relacionada con su alto contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos (9).

Herbidas

Los herbidas son una clase heterogénea de agentes químicos, extensamente utilizados en la agricultura, selvicultura y jardín para eliminar a hierbas y follaje indeseados. Aunque los campesinos y los trabajadores que laboran en las plantas que fabrican los herbidas están

expuestos a altas concentraciones, la población entera está probablemente expuesta a algún nivel de contaminación con herbicidas

Estudios en varios países proveen una significativa evidencia que apoya una relación entre el linfoma no-Hodkin en campesinos y su exposición a fenoxiherbicidas (9)

Contaminantes del aire y agua

La evidencia de que carcinógenos potenciales están presentes en el aire y agua y que estos pueden originar cáncer, está basada en datos epidemiológicos. Una de las suposiciones es que existe una relación dosis respuesta, no lineal y sin umbral entre la dosis dada de carcinógenos y el número de casos de cáncer (9)

Grandes áreas metropolitanas tienen un nivel más alto de carcinógenos atmosféricos –tales como el benzo[*a*]pireno, resultante de la combustión de gasolina y diesel- que las áreas rurales, de este hecho, algunos estudios mostraron que los no fumadores en áreas urbanas no tienen un riesgo significativamente más alto de cáncer de pulmón que los no fumadores rurales. Sin embargo, los fumadores urbanos tienen una incidencia significativamente más alta de cáncer de pulmón que los fumadores considerados como fumadores duros en áreas rurales. Estas observaciones y otras soportan la idea de que una combinación de la contaminación del aire y otros factores de riesgo son la combinación más carcinogénica (122).

Numerosos carcinógenos potenciales han sido encontrados en aire y agua, particularmente en áreas cerca de grandes complejos industriales pero además las efluentes de las plantas tratadoras de aguas negras pueden contener sustancias carcinogénicas que pueden encontrar un camino hacia el suministro de agua potable (9)

Radiación

Luz ultravioleta.- Desde hace mucho tiempo es bien conocido que la exposición a la irradiación UV o ionizante puede causar cáncer en humanos. La asociación entre el cáncer de piel y la exposición a la luz del sol fue observada hace más de 100 años, y en 1907 William Dubreuilh, un dermatólogo francés, reportó una evidencia epidemiológica implicando a la luz del sol como una causa de cáncer de piel, apoyando las observaciones anteriores (12) En 1928 George Findlay, un patólogo británico, experimentalmente verificó esto, induciendo cáncer de piel en ratones expuestos a radiación UV (13). La radiación UV es una energía de baja emisión y no penetra profundamente, por lo que la piel absorbe mucha de esta radiación y es el blanco primario

Radiación ionizante.- Los efectos carcinogénicos de la radiación ionizante fueron descubiertos en investigadores ocupacionalmente expuestos, pacientes que fueron expuestos a radiación diagnóstica o terapéutica y sobrevivientes de la bomba atómica El tipo de neoplasia producido en individuos expuestos a radiación ionizante depende de varios factores, incluyendo la dosis de la radiación, la edad al tiempo de la exposición y sexo del individuo (9)

Fármacos

Los fármacos contra el cáncer han sido implicados como un factor de riesgo para desarrollar cánceres secundarios Varios de estos fármacos (Ej Ciclofosfamida, melfalán y busulfán) son agentes alquilantes, que interactúan con el ADN en una forma similar a varios mutágenos y carcinógenos químicos

Muchos de los cánceres secundarios aparecen como consecuencia al tratamiento con fármacos. Se ha estimado que cerca del 3 al 12 % de los niños tratados con fármacos contra el cáncer pueden desarrollar un nuevo cáncer dentro de los próximos 20 años después del primer diagnóstico (14)

Otros fármacos son también señalados como agentes causantes de cáncer. Por ejemplo, han sido reportados casos de tumores de hígado en pacientes con desórdenes sanguíneos tratados por largos periodos con el esteroide androgénico oximetolona (15) Varios estudios indican que el abuso crónico de analgésicos que contienen fenacetina provoca necrosis papilar del riñón y ha sido sugerido que éste sea relacionado al subsecuente desarrollo de un carcinoma transicional de la pelvis renal en un gran número de casos (15)

Infección

El cáncer no es un padecimiento infeccioso en el sentido usual del término sin embargo, hay una clara asociación entre la infección con ciertos tipos de virus y padecimientos neoplásicos. Tales infecciones probablemente actúan junto con otros agentes carcinógenos Se ha observado una estrecha asociación entre infecciones con el virus Epstein-Barr y el linfoma de Burkitt, el virus de la hepatitis B y el cáncer de hígado, el virus linfotrófico de células T humanas (HTLV) y la leucemia y el papilomavirus humano con el cáncer cervicouterino. Un gran número de neoplasias también han sido asociadas con el VIH en pacientes con SIDA. Estas neoplasias incluyen el sarcoma de Kaposi y el linfoma no-Hodgkin (16).

CARCINOGENÉISIS

Es conocido que la carcinogénesis ocurre en varias etapas: la iniciación, la promoción y la progresión. El crecimiento selectivo o preferencial de poblaciones celulares intermediarias es uno de los factores limitantes en todo el proceso. El rango de crecimiento es controlado por la diferencia entre los rangos de replicación celular (α) y los rangos de muerte celular (β). Obviamente, el crecimiento de poblaciones celulares puede ocurrir a través de un incremento de α o un decremento de β , o una combinación de los dos (123).

Un modelo de progresión del cáncer en tejido epitelial, propone que inicialmente, ciertas alteraciones genéticas inducen un trastorno en la proliferación celular, lo que conlleva a una hiperplasia, que es la acumulación de células que no presentan aún ninguna alteración en sus características funcionales ni morfológicas. Posteriormente, al acumularse más alteraciones genéticas, algunas células empiezan a presentar alteraciones morfológicas y funcionales y es entonces cuando se dice que se tiene una displasia, en esta etapa, las células empiezan a perder las características propias del tejido al cual pertenecen y como consecuencia, el órgano afectado no realiza sus funciones adecuadamente (17). La adquisición y acumulación de un mayor número de alteraciones genéticas deforma aún más la apariencia, el funcionamiento y el crecimiento celular y tisular, pudiendo las células displásicas, empezar a invadir tejidos circundantes, en ese momento se da la transición de una lesión preneoplásica a un cáncer (18). La evolución de la enfermedad podría conferir a las células tumorales la capacidad de invadir el torrente sanguíneo e iniciar el desarrollo de un nuevo tumor en un sitio diferente, es decir el tumor adquirirá capacidad metastásica (18).

Mecanismo de iniciación

La iniciación de la transformación maligna de una célula normal por un agente carcinógeno implica un cambio permanente y heredable en la expresión genica de la célula transformada. Este cambio podría provenir de eventos mutagénicos o directamente de un genotóxico, en donde un agente carcinógeno reacciona con el ADN, o por eventos indirectos o epigenéticos que modulan la expresión génica sin que reaccionen directamente con la secuencia de bases del ADN (9). Cuando se habla de que el cambio es permanente y heredable se habla de una falla en la reparación del ADN. Sin embargo se ha observado que en la mayoría de los casos una sola mutación no es suficiente para generar cáncer sino que son necesarias más de tres para que esto ocurra. Es claro que el cáncer es una enfermedad de la edad y este hecho apoya la noción de que la acumulación de errores genéticos durante la vida es muy dañina para el genoma humano (9).

Mecanismo de promoción

Después de que una célula ha sido iniciada, es decir que obtuvo un cambio genotípico y fenotípico debido a un daño en el ADN, la célula comienza una expansión clonal bajo la influencia de agentes promotores que actúan como mitógenos para el tipo celular transformado. El aislamiento y caracterización de agentes promotores tumorales ha provisto de muchas herramientas para el estudio del mecanismo de promoción *in vitro* e *in vivo*. De los agentes promotores, los ésteres de forbol han sido los más ampliamente estudiados. Estos ésteres son compuestos a los que diariamente estamos expuestos en nuestra dieta, en el humo del cigarro y otras clases de agentes ambientales. Los ésteres de forbol promotores producen una amplia variedad de cambios bioquímicos en las células. Un gran número de

esos cambios está relacionado con la habilidad de esos agentes para promover el crecimiento de células iniciadas *m vivo* (9)

Mecanismo de progresión

Se puede resumir que la fase de promoción es un estado de proliferación celular y expansión clonal inducida por un estímulo mitogénico y la fase de progresión es la evolución gradual de células alteradas genotípicamente y fenotípicamente que ocurre gracias a la inestabilidad de las células en progresión. Este proceso conduce al desarrollo de una heterogeneidad celular dentro de un tumor (19)

La progresión tumoral está caracterizada por inestabilidad cariotípica, aneuploidia, varias anomalías cromosómicas y el surgimiento de las características invasivas y metastásicas

Durante la fase de progresión, la cual puede durar varios años en humanos, los tumores individuales desarrollan heterogeneidad de acuerdo a sus características invasivas y metastásicas, su especificidad antigénica, estado de diferenciación celular y respuesta a hormonas, fármacos y agentes inmunomoduladores (9)

La activación de oncogenes adicionales y pérdida de la función de genes supresores tumorales generalmente acompaña a esta fase. Por ejemplo en cáncer de colon humano, la activación de *Kras* y pérdida de p53 ocurre en poliposis adenomatosa a diferentes tiempos durante la progresión a adenocarcinoma (9)

LA QUIMIOTERAPIA Y EL CÁNCER

Aunque el tratamiento de tumores con fármacos tiene sin duda sus raíces en la antigüedad, la era moderna de la quimioterapia anticáncer, que involucra la investigación de agentes alquilantes y antimetabolitos, probablemente comienza antes de terminar la Segunda Guerra Mundial. En el caso de los agentes alquilantes, las observaciones de los efectos tóxicos del gas de mostaza y sus análogos, sobre la sangre y médula espinal fue reportado después de la primera guerra mundial. Sin embargo, el concepto de que la toxicidad a tejidos normales podría ser usada en la búsqueda de tratamientos contra padecimientos neoplásicos no estuvo tan claro y fue sugerido hasta 1960 (20).

El descubrimiento de nuevos agentes efectivos contra el cáncer a través de observaciones de toxicidad en tejido normal ha ocurrido en más de una ocasión. El ejemplo clásico del uso de las observaciones de toxicidad en tejido normal para propósitos terapéuticos es el mitotano (*o,p'*-DDD). En el curso de la evaluación de la toxicidad de insecticidas, incluyendo DDT, Nelson y Woodard (20) observaron que el DDD únicamente causaba atrofia severa en la corteza adrenal. Después fue encontrado que el componente activo era el *o,p'*-DDD, el cual después se mostró que era efectivo en el tratamiento de carcinoma adrenocortical (20). Este ejemplo del uso de observaciones de toxicidad para propósitos terapéuticos nos muestra que la serendipia juega un papel muy importante en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Para el caso del área de antimetabolitos, un gran número de investigaciones comenzaron poco después del fin de la segunda guerra mundial, el énfasis mayor comenzó en las áreas de los antagonistas del ácido fólico y las purinas y pirimidinas. La era de los antifolatos comenzó con lo que Farber describió como un "fenómeno de aceleración" en el proceso leucémico en niños con leucemia aguda, tratados con conjugados del ácido fólico

Esto condujo a la hipótesis de que los antagonistas del ácido fólico podrían ser usados terapéuticamente y eventualmente a la evaluación clínica del metotrexate un fármaco que es usado hasta la fecha (20)

El concepto de que la interferencia con el metabolismo de los ácidos nucleicos podía tener beneficios terapéuticos generó grandes esfuerzos en los investigadores a nivel básico y aplicado para entender el proceso y desarrollar agentes análogos de la purina y pirimidina. El primero de esos agentes que mostró una amplia utilidad fue la 6-mercaptopurina (6-MP) Aunque este agente no puede ser considerado el resultado específico de un diseño racional, la investigación básica bioquímica y farmacológica y los extensos estudios estructura actividad resultaron en numerosos fármacos usados no solo en cáncer sino también en otros padecimientos como son, infecciones con protozoarios y virus, inmunosupresión y trasplante y en gota e hiperuricemia (20)

Uno de los mejores ejemplos de diseño racional es el del 5-fluorouracilo (5-FU), en el cual, Heidelberguer et al (21) consideraron que una purina o pirimidina con un fluoruro como sustituyente podría ser usada porque el fluoruro tiene efectos significantes cuando sustituye al hidrógeno y los antagonistas de los ácidos nucleicos mostraban efectos benéficos (21)

Aunque uno desearía que el diseño racional de compuestos resultara en nuevos y eficientes fármacos, la experiencia nos muestra resultados decepcionantes. Algo que ha sido más productivo es el desarrollo racional de agentes ya usados a través de estudios estructura-actividad y la explotación de cabezas de serie (*leads*) descubiertos empíricamente. Un excelente ejemplo de este hecho es el del compuesto 1,4-bis{2-[(2-hidroximetil)amino]etilamino}-9,10-antracenediona. Originalmente desarrollado como una tinta para plumas, este compuesto fue sometido a un tamizado de rutina por parte del

Instituto Nacional de Cáncer (NCI) y se observó una actividad significativa lo que condujo a una investigación sistemática estructura actividad que resulto en el desarrollo del fármaco comercial mitoxantrona (20)

Como se mencionó anteriormente, la serendipia tradicionalmente ha jugado un papel muy significativo en el descubrimiento de agentes quimioterapéuticos, no solo en cáncer, sino en el espectro entero de padecimientos humanos. Uno de los mejores ejemplos en el cáncer es el del cisplatino. En el curso del estudio de los efectos de corrientes eléctricas sobre el crecimiento bacteriano, Rosenberg y sus colaboradores (20) observaron que las células de *Escherichia coli* formaban largos filamentos, pero las células no se dividían. Así surgió la hipótesis de que este compuesto podía tener efectos sobre los tumores, lo que posteriormente se comprobó y ahora este fármaco se utiliza contra una variedad de tumores (20)

La búsqueda de agentes contra el cáncer se ha extendido a una gran cantidad de productos naturales, dentro de los cuales están productos de fermentaciones microbianas y extractos de plantas

Los productos de fermentación microbiana que han jugado un gran papel en la quimioterapia y que siguen en uso son la mitomicina C y la actinomicina D, ambos derivados de especies de *Streptomyces*. Con una mayor importancia clínica ahora se tiene a la daunorubicina y la doxorubicina derivadas de cultivos de *Streptomyces peucetius* (20).

En el caso de las plantas, la medicina tradicional ha ayudado a descubrir una gran cantidad de agentes quimioterapéuticos contra una variedad de padecimientos. En el área de agentes contra el cáncer han ocurrido varios ejemplos de serendipia, como lo fue con la vincristina y la vinblastina las cuales fueron descubiertas ya que había reportes de que las hojas de *Vinca rosea* preparadas en té eran eficientes contra la diabetes mellitus, lo que

llevó a Noble et al (20) a obtener una muestra del material para probarlo, pero demostraron que no tenían tal efecto. Sorpresivamente, sin embargo, el material fue inyectado en ratas y se observó que existía una severa depresión en los componentes de su sangre. Este descubrimiento accidental condujo al aislamiento, purificación e identificación de la vinblastina y posteriormente de la vincristina, ambas efectivas contra diferentes tipos de leucemias (124).

Taxol

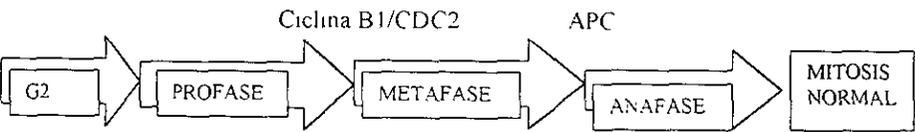
La utilidad clínica de la vincristina y vinblastina estimuló una amplia y sistemática búsqueda por parte del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) en productos naturales, especialmente en las plantas. Uno de los más importantes productos de plantas derivado de este programa es el Taxol. Este compuesto se obtiene de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* (Taxaceae) y fue primeramente aislado por Wall et. al., en 1971 quienes lo obtuvieron con un rendimiento del 0.007% (22).

El taxol es efectivo para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo metástasis de mama, cáncer de ovario, esófago, próstata, vejiga, endometrio, cervix, cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma y linfoma de Kaposi (22).

El mecanismo de acción del taxol es atribuido a su capacidad de unirse a los microtúbulos y estabilizarlos, previniendo su desensamble, lo que evita la división celular, manteniendo a la célula en la fase G_2/M y después esto la conduce a apoptosis (23). Sin embargo se ha observado que la fase del ciclo celular en la cual las células cancerosas sobreviven a apoptosis difiere, dependiendo de su exposición a bajas o altas dosis de taxol. Las dosis altas de taxol inducen apoptosis temprana en la fase G_2/M , pero a dosis bajas hay una apoptosis retardada (pos-mitótica) en la fase G_1 (24).

Se ha observado que las actividades de la ciclina B1/CDC2 y la proteína verificadora MAD2 se incrementan durante la apoptosis inducida por el taxol. MAD2 es activada para inhibir la habilidad de APC de ubiquitinar a la ciclina B1, lo cual previene la degradación de la ciclina B1 y permite una más larga actividad del complejo B1/CDC2. La activación desregulada de las ciclinas B1/CDC2 genera una serie de cascadas de fosforilación para aumentar la progresión de la prometáfase, pero por otra parte, la activación de MAD2 hace a las células incapaces de salir de la metafase (24) Bajo estas circunstancias, las células sufren una catástrofe mitótica y por último van a apoptosis (fig 1)

CÉLULAS NORMALES



CÉLULAS TRATADAS CON TAXOL

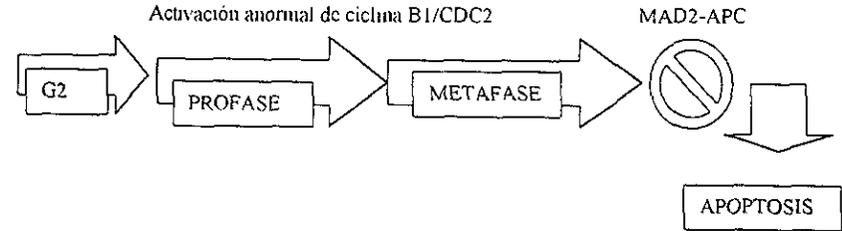


Fig 1 Tomada de (24)

También se han observado cambios en el estado de fosforilación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL después del tratamiento con taxol a una concentración mayor a 10 nM, pero por otro lado también se ha observado que las proteínas

proapoptóticas como Bax permanecen sin modificación (25) y se ha propuesto que la fosforilación de Bcl-2 reduce la formación de heterodímeros con Bax revocando su habilidad de prolongar la supervivencia celular (25)

Debido al bajo rendimiento en la extracción del taxol de sus fuentes naturales, actualmente se han hecho estudios con varias estructuras que se cree son responsables de la actividad de este compuesto y que pueden ser sintetizadas para formar nuevos productos con semejante actividad. Unos de esos nuevos análogos son el taxotere y el nonataxel, los cuales son más activos que el compuesto original (125)

Actualmente el taxol también ha sido usado en investigación, utilizándolo como un control positivo de actividad antitumoral y como productor de apoptosis, además también está siendo usado para purificar e investigar proteínas asociadas a microtúbulos (MAP's) debido a su asociación específica con los microtúbulos (126)

Lactonas sesquiterpénicas

Una serie de compuestos con actividad promisorio que ha arrojado la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica en productos naturales son las lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un vasto y diverso grupo de compuestos presentes en varias familias de plantas como metabolitos secundarios (26) Entre las familias que las contienen se encuentran las siguientes: *Acanthaceae*, *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliceae*, *Menispermaceae*, *rutaceae*, *Winteaceae* y *Hepatidae*, sin embargo el mayor número de estos compuestos ha sido reportado en la familia *Asteraceae* (Compositae), con más de 3000 estructuras diferentes reportadas (27)

Las lactonas sesquiterpénicas son terpenos formados de la condensación cabeza-cola de tres unidades de isopreno y la subsecuente ciclización y transformación oxidativa para producir una lactona fusionada. Estos compuestos son primariamente clasificados en base a sus esqueletos carbocíclicos dentro de germanocranolidas, guaianalidas, eudesmalidas, pseudogualinolidas y xantonolidas. Una especie individual de plantas generalmente produce un solo tipo de esqueleto concentrado generalmente en las hojas y las flores y el porcentaje de estos metabolitos secundarios por peso seco de la planta varía de 0.01% a 8% (27).

Las plantas que contienen lactonas sesquiterpénicas son usadas como remedios en diversas culturas. Una especie de planta que contiene lactonas sesquiterpénicas es *Arnica montana*, la cual es utilizada como remedio anti inflamatorio, o en forma de unguentos y comprimidos es usada para el tratamiento de hematomas, contusiones, torceduras y enfermedades reumatoides (28). La raíz de *Ratibida mexicana* es usada por los Tarahumaras para el tratamiento de reumas (29). Se sabe que el efecto anti inflamatorio de las lactonas sesquiterpénicas es debido a que inhiben selectivamente el factor de transcripción NF- κ B al prevenir la degradación de I κ B (28, 30). El NF- κ B regula la transcripción de varias citocinas inflamatorias tales como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, y TNF- α por lo que su inhibición evita la transcripción de estas citocinas, previniendo la inflamación. El NF- κ B está normalmente asociado a su inhibidor I κ B y en presencia intermediarios reactivos de oxígeno, el I κ B es degradado y el NF- κ B es activado. Así las lactonas sesquiterpénicas evitan su activación protegiendo al inhibidor I κ B de su degradación (30).

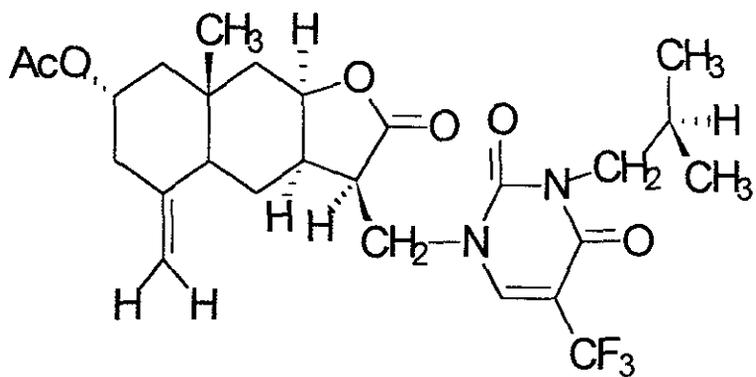
Las lactonas sesquiterpénicas presentan actividad antimicrobiana moderada contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus lutea* pero no presentan actividad contra bacterias Gram-negativas (31) Además también presentan actividad antifúngica e inhibitoria del fitocrecimiento (26)

También se ha observado que estos compuestos previenen lesiones gástricas producidas por etanol por lo que se considera que tienen propiedades antiulcerativas. Las partes aéreas de la planta *Artemisia douglasiana*, son usadas tradicionalmente como agentes citoprotectores contra el desarrollo de úlcera péptica (32) Se ha especulado que esta actividad puede estar relacionada con la inducción de la liberación de prostaglandinas endógenas Se ha demostrado que las prostaglandinas pueden proteger a la superficie epitelial contra algunos tipos de daño, por aumentar la cantidad de fosfolípidos en la superficie, lo cual hace hidrofóbica la superficie de la mucosa y así disminuye la accesibilidad de ácidos y otros agentes solubles en agua (32)

La actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas, se ha observado en células de leucemia de ratón P-388 (33), L-1210, P815 (31), en líneas celulares de cáncer de pulmón humano A549, A427, GLC₄ (29,34,35) en las líneas celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama) (29), COLO 320 (cáncer colorectal) (35), HL-60 (leucemia) (34, 35), SK-OV-3 (adenocarcinoma de ovario) (35) y en la línea celular tumoral HeLa (cáncer de cervix)

Debido a la alta citotoxicidad de las lactonas sesquiterpénicas que no distingue entre células normales y cancerosas, actualmente se está intentando hacer modificaciones estructurales en estas moléculas, para así poder lograr una mayor especificidad citotóxica Quintero et al (127) demostraron la actividad citotóxica de varios derivados pirimídicos de lactonas sesquiterpénicas en las líneas celulares HeLa, C-33, INBL, VIPA, MCF-7 y CHO Dentro de los derivados pirimídicos con actividad, el que tuvo una mayor actividad citotóxica, fue el compuesto III JLNZ-106, con un valor de IC₅₀ de 16 40 μM en la línea celular HeLa, esta línea fue la más sensible al compuesto (127)

A



B

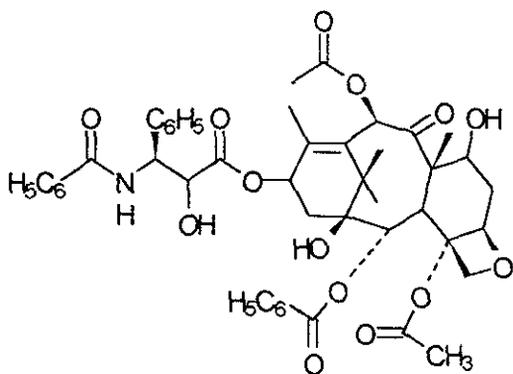


Figura 1. A) estructura del compuesto III JLNZ-106. B) estructura del taxol.

MUERTE CELULAR.

Los animales multicelulares frecuentemente necesitan eliminar células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas, para lograr esto, las células utilizan un programa molecular exclusivo para ésta tarea. Tan importante como la división y la migración celular, la muerte celular programada (MCP) permite a un organismo mantener la homeostasis controlando el número de células y el tamaño de tejido (38).

La apoptosis es una forma de MCP, la cual tiene como objetivo dos funciones principales: una es la eliminación controlada de células excesivas e indeseadas para el organismo (Ej. durante la atrofia o involución de tejidos) y la otra es la de eliminar células después de un daño citotóxico. La MCP es un proceso genéticamente controlado, cuya ocurrencia requiere de síntesis de ATP, síntesis de proteínas y el mantenimiento del potencial de membrana. Si el daño es severo e incapacita esas funciones celulares esenciales, el proceso ordenado de la MCP puede no ocurrir y una forma de muerte celular lítica puede aparecer, esta forma de muerte es ahora referida como necrosis (41)

Al analizar morfológicamente células que morían en diferentes circunstancias Kerr, Wyllie y Curie (1972) fueron los primeros en observar dos tipos distintos de muerte celular (36). Posteriormente a estos dos tipos de muerte se les llamó necrosis y apoptosis, estos son dos modos distintos y mutuamente exclusivos de muerte celular (37)

La necrosis, también llamada muerte celular patológica o accidental, ocurre cuando las células son expuestas a una variación extrema de las condiciones fisiológicas, (Ej. hipertermia, hipoxia) lo cual puede resultar en un daño a la membrana plasmática. Aunque también puede haber necrosis sin existir antes un daño a la membrana, como sucede en respuesta al ataque celular por litiovirus (41)

La necrosis aparentemente comienza con una incapacidad de las células para mantener la homeostasis, dirigiéndolas a una pérdida de la permeabilidad de la membrana y la consiguiente entrada de iones extracelulares y agua. Los organelos intracelulares, más notablemente la mitocondria y en general toda la célula, sobrevienen a un hinchamiento y ruptura (lisis). Debido a esta lisis los contenidos citoplasmáticos, incluyendo enzimas lisosomales, son liberados al fluido extracelular, por lo que *in vivo*, la necrosis es asociada con un daño extensivo a tejidos, lo que origina una respuesta inflamatoria extensa (38)

En contraste, la apoptosis es un modo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales en donde la propia célula es participante activo de su muerte.

En una célula que sobreviene a apoptosis se activan una serie de eventos moleculares y bioquímicos, los cuales la dirigen a su desintegración física total. Uno de los eventos tempranos es la deshidratación celular, la pérdida de agua intracelular origina la condensación del citoplasma, lo cual resulta en un cambio en el volumen y tamaño de la célula provocando su encogimiento. Otro cambio, quizá el más característico de la apoptosis es la condensación de la cromatina nuclear. Esta condensación comienza en la periferia nuclear y la cromatina condensada a menudo aparece como una figura cóncava, como media luna o herradura. El ADN en la cromatina condensada (picnótica) exhibe hipercromasia, tiñéndose fuertemente con colorantes. La envoltura nuclear se desintegra, las proteínas laminares sobrevienen a degradación proteolítica, seguida por fragmentación nuclear (*karyorrhexis*). La activación de endonucleasas que preferentemente rompen el ADN entre los nucleosomas es otro evento característico de la apoptosis. Los fragmentos nucleares, junto con los constituyentes del citoplasma (incluyendo organelos intactos), son empacados y envueltos por fragmentos de la membrana plasmática. Estas estructuras,

llamadas cuerpos apoptóticos, son entonces desprendidas de la célula muerta. Cuando la apoptosis ocurre *in vivo*, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas, incluyendo las de origen epitelial o fibroblastos (es decir no necesariamente por macrófagos profesionales), sin que se produzca una reacción inflamatoria en el tejido (36, 37, 39-43)

El término apoptosis es usado frecuentemente como sinónimo de MCP, sin embargo, esto no toma en cuenta la existencia de diferentes tipos de MCP. La definición original de apoptosis fue basada en los cambios morfológicos de las células observados por Kerr y Wyllie (36). Otros tipos de MCP distintos de apoptosis incluyen la muerte autofágica-lisosómica [tipo II de acuerdo a Schweichel y Merker]. Esta es caracterizada por la aparición temprana de lisosomas y vacuolas autofágicas, las cuales degradan la mayoría del contenido citoplasmático antes de la condensación nuclear. Otra forma de MCP es la del tipo III la cual es caracterizada por una desintegración morfológica de las células (88).

BIOQUÍMICA DE LA APOPTOSIS.

Para que todos los cambios morfológicos antes mencionados se lleven a cabo al desencadenarse la apoptosis, es necesario que estos procesos bioquímicos sean mediados por efectores de muerte, tales como proteasas, las cuales pueden originar la fragmentación nuclear y celular. Pero, antes de la activación de estas vías efectoras de muerte, el balance de vida y muerte de la célula es modulada por la interacción de activadores de muerte. Así cuando el balance se inclina hacia la muerte, los efectores de muerte inician el desensamble de la célula sistemáticamente (45)

SEÑALES DE MUERTE EXTRACELULARES.

La supervivencia celular depende de que la célula reciba las señales extracelulares apropiadas. En la ausencia de esas señales, ha sido propuesto que la única opción que le queda a la célula, es su muerte por apoptosis (46)

Integrinas

Los receptores a integrinas juegan un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo apoptosis, migración celular, desarrollo embrionario y metástasis tumoral (47)

Las integrinas conectan la matriz extracelular (MEC) al citoesqueleto y juegan un papel clave en la supervivencia celular (45). Ellas tienen también un sitio de fosforilación a tirosina y contienen múltiples moléculas de transducción de señales, incluyendo receptores para factores de crecimiento solubles y muchas de sus moléculas efectoras río abajo. Las células privadas del contacto con la MEC vía integrinas sobreviven a apoptosis mediada por la vía de señalización de cinasas y cisteinproteasas (48). Las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \omega \beta 3$ y $\alpha 1\beta 1$ están involucradas en la protección de diversos tipos de células contra apoptosis, o la propagación de supervivencia (45).

Factores de crecimiento y citocinas

La supervivencia celular es determinada por la exposición apropiada a factores de crecimiento (46) sin embargo, ciertas citocinas pueden sobrepasar esos factores de soporte y directamente iniciar la muerte celular. Dos ejemplos de estas citocinas son el ligando de Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales se unen a la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso/TNF (49). La apoptosis se da cuando la señal atraviesa la membrana por medio de aquellos receptores que contienen el dominio de muerte, un

motivo, que directamente se asocia con moléculas efectoras intracelulares, las cuales median la apoptosis (50)

Receptores asociados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteína G pueden también, jugar un papel significativo en la mediación de la apoptosis (45). Por ejemplo, los receptores a glutamato (mGluRs) pueden modular la apoptosis en cultivos neuronales primarios. Se ha observado que la protección es mediada por la inhibición de la adenilato ciclasa seguido de la activación dual de receptores del grupo II, mGlu₂, mGlu₃ y del grupo III, mGlu_{4a,b}, mGlu₆, mGlu₇, mGlu₈ (51,52).

Esfingomielina y ceramida

La esfingomielina es un fosfolípido que está localizado preferencialmente en la parte externa de la membrana plasmática, y puede ser catabolizada por tres isoformas distintas de una fosfolipasa, llamadas, esfingomielinasas (SMasas). Muchas células de mamíferos son capaces de señalar a través de la ruta de la esfingomielina, la cual puede ser activada utilizando receptores de TNF o Interleucina-1 además de estrés (UV, H₂O₂, radiación ionizante). La hidrólisis de la esfingomielina por las SMasas produce fosfocolina y ceramida. la cabeza de la fosfocolina es liberada al medio extracelular, mientras que la ceramida se difunde dentro de las membranas, actuando como un segundo mensajero. La generación de ceramida en varios sistemas celulares ha sido asociada con la diferenciación.

proliferación celular y apoptosis (53) Así, ha sido reportado que la ceramida generada de las SMasas activa la vía de las cinasas río abajo (54)

Mucha de la evidencia que apoya la relación entre la generación de ceramida y la inducción de apoptosis, involucra la activación de una isoforma particular de SMasa, llamada SMasa ácida y la subsiguiente activación de cinasas y proteasas, una u otra, o en paralelo, dependiendo del estímulo y tipo de célula, o de ambos (53, 54)

REGULADORES INTRACELULARES DE MUERTE

Existen numerosas hipótesis que implican mediadores o vías específicas en la apoptosis. Algunas de esas vías ocurren tempranamente en el proceso apoptótico para iniciar a la célula en el proceso de muerte y para activar los efectores de muerte. Estas vías incluyen proteínas expresadas por protooncogenes (ej miembros de la familia BCL-2) y cinasas (ej proteincinasas activadas por estrés)

El supresor tumoral p53

El gen p53 codifica para un polipéptido tetramérico de 393 aminoácidos. Basado en varios análisis estructura/función, p53 ha sido dividido en varios motivos. La región del amino terminal muestra una función de transactivación. Se ha demostrado que esta región interactúa con componentes de la maquinaria transcripcional tales como la proteína de unión a TATA (55). También en esta región ha sido mostrado que la oncoproteína Mdm2 se une a p53 y regula negativamente la función de transactivación. Adyacente al dominio amino terminal, se encuentra un dominio rico en prolina el cual es importante para la

función supresora tumoral de p53 (56) Un motivo central es el que confiere a p53 una actividad de unión a ADN secuencia específica. La región carboxilo terminal contiene actividad de unión a ADN pero esta unión no es secuencia específica Una región pequeña en este extremo regula la oligomerización de p53 (56)

Los niveles de la proteína p53 aumentan dramáticamente en respuesta a diversas formas de estrés incluyendo, radiación ionizante, radiación UV, privación de factores de crecimiento, tratamiento con quimioterapia, activación de oncogenes, choques caloríficos, o infección por virus También ha sido mostrado que p53 es inducido por hipoxia en células tumorales (57)

La regulación a la alta de p53 ocurre primariamente al nivel postraducciona. Cambios en la estabilidad de la proteína p53 resulta en un rápido surgimiento de ésta dentro de la célula Las consecuencias fenotípicas primarias de la inducción de p53 son arresto del ciclo celular o en su caso muerte celular apoptótica (figura 2)

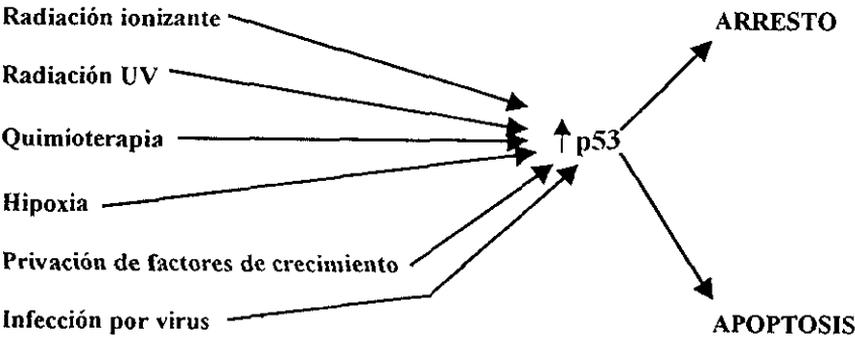


FIGURA 2 respuestas mediadas por p53 Tomada de (129)

Regulación de apoptosis por p53

En la actualidad existe un modelo, llamado modelo dual, el cual considera que p53 regula el ciclo celular y la apoptosis vía distintos mecanismos. Al tener p53 la función de factor de transcripción existe la búsqueda de blancos transcripcionales y en la actualidad un gran número de blancos potenciales han sido identificados. Por ejemplo el gen Bax que es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, tiene un promotor altamente responsivo a p53 (57). Adicionalmente otros blancos de p53 incluyen a los receptores de muerte TRAIL y Fas (58)

También ha sido sugerido que p53 puede regular la apoptosis mediante una vía independiente de la transcripción. La primera evidencia de esto viene de la observación de que la apoptosis inducida por p53 fue resistente al tratamiento con el inhibidor de la transcripción actinomicina D o el inhibidor de la traducción cicloheximida (58)

La familia Bcl-2

Una variedad de señales de muerte celular, (algunas mencionadas anteriormente) así como de daños celulares patológicos, encienden la vía genéticamente programada de la apoptosis (59).

La apoptosis se manifiesta en dos principales programas de ejecución, río debajo de la señal de muerte: la vía de las caspasas y la disfunción organelar, de la cual, la disfunción de la mitocondria es la mejor caracterizada (60, 61)

Como los miembros de la familia BCL-2 residen río arriba del daño celular irreversible y están enfocados a nivel mitocondrial, ellos juegan un papel de pivote en la decisión de si una célula vive o muere (63)

Bcl-2 fue primeramente identificado como un protooncogen en células β foliculares de linfoma, en donde fue encontrado en el punto de ruptura de la translocación entre el cromosoma 18 y el 14 (62)

Los miembros de la familia Bcl-2 pueden ser divididos dentro de dos grupos de acuerdo a su función, los miembros antiapoptóticos y los proapoptóticos. (fig 3)

| ANTIAPOPTOTICOS | PROAPOPTOTICOS | |
|-----------------|----------------|----------|
| -Bcl-2 | -Bax | -Bid |
| -Bcl-XL | -Bak | -Bik/Nbk |
| -Bcl-W | -Bok | -Bim |
| -Mcl-1 | -Bcl-Xs | -Krk |
| -A1 | -Bad | |
| -BAR | --Mtd | |

Fig 3 Miembros de la familia Bcl-2 con actividad pro y antiapoptotica (62-67)

Estructura primaria.

Muchos de los miembros de la familia Bcl-2 poseen cuatro dominios de homología altamente conservados, llamados dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 (68). Se ha demostrado que esos dominios median las interacciones proteína-proteína entre los miembros de la familia para formar homo o heterodímeros (63).

También se ha observado que los dominios BH1 y BH2 son requeridos para que Bcl-2 y Bcl-XL interactúen con Bax y supriman la apoptosis (69).

Los miembros antiapoptóticos muestran una menor conservación del dominio BH4, el único miembro proapoptótico que lo contiene es Bcl-Xs. Estudios de delección y mutagénesis muestran que el dominio BH3 sirve como un dominio de muerte en los miembros proapoptóticos. Este concepto es apoyado, ya que la introducción del dominio BH3 de Bax en Bcl-2 es suficiente para convertir a Bcl-2 en una proteína proapoptótica (70). Además de que recientemente ha emergido una gran cantidad de miembros que son proapoptóticos y contienen únicamente el dominio BH3 (70)

Estructura tridimensional.

La estructura tridimensional ha sido evaluada para dos proteínas de la familia. Bcl-XL y Bid. Bcl-XL muestra homología estructural con los dominios formadores de poros de ciertas toxinas bacterianas, en particular la toxina de la difteria y las colicinas A y E1. La estructura de Bcl-XL consta de dos hélices centrales hidrofóbicas ($\alpha 5$ y $\alpha 6$) rodeados por 5 hélices anfipáticas y un asa flexible de 60 residuos de aminoácidos. Los dominios BH1, BH2 y BH3 están localizados en estrecha proximidad sobre la superficie de la proteína, formando una grieta hidrofóbica elongada, la cual representa el sitio de unión del dominio BH3 de Bak. El asa flexible localizado en el extremo amino terminal del dominio BH3 contiene varios sitios potenciales de fosforilación (71). La estructura de Bid es muy similar a la estructura de Bcl-XL (72)

Activación premitocondrial de los miembros de la familia bcl-2

Una proporción considerable de los miembros Bcl-2 tanto pro como antiapoptóticos se localiza en compartimentos celulares por separado en la ausencia de una señal de muerte. Los miembros antiapoptóticos son inicialmente proteínas de membrana encontradas en la mitocondria, retículo endoplásmico o membrana nuclear (73-75). En contraste, una fracción substancial de los miembros proapoptóticos se localizan en el citosol o en el citoesqueleto antes de una señal de muerte (76). Después de una señal de muerte, los miembros proapoptóticos sufren un cambio conformacional que originan que ellos pueden integrarse a las membranas, especialmente a la membrana mitocondrial externa (76).

Modificaciones postraduccionales

Dimerización

La activación de la molécula proapoptótica BAX involucra su translocación subcelular y dimerización. En células viables una porción substancial de BAX es monomérica y se encuentra en el citosol, siguiendo a un estímulo de muerte, el BAX citosólico y monomérico se trasloca a la mitocondria, donde se vuelve una proteína integral como homodímero(77,78). En experimentos en los cuales se forzó a BAX a dimerizar por medio de una proteína de unión (FK1012) se observó que este dímero se translocó a la mitocondria y fue capaz de matar células aun en la presencia de factores de supervivencia y BCL-XL (78).

Translocación

En células sanas, las moléculas de la proteína proapoptótica BIM están localizadas en el complejo motor asociado al microtúbulo, a través de su unión con la cadena ligera de dineína (LC8) (79). Después de una señal de muerte, LC8 y BIM se disocian del complejo motor y juntos se translocan a la mitocondria, ya en la mitocondria BIM interactúa con BCL-2 para antagonizar su actividad antiapoptótica (79).

Fosforilación

En presencia de un factor de supervivencia, la molécula proapoptótica BAD, es fosforilada en los sitios de serina (ser-112 y ser-136) y secuestrada en el citosol por una molécula llamada 14-3-3 (80). Después de una señal de muerte, por ejemplo deprivación de IL-3, BAD es desfosforilada y se ha encontrado en asociación con BCL-XL y BCL-2. El dominio BH3 de BAD parece esencial para su interacción con BCL-XL y BCL-2; además de que se cree que la fosforilación regula la exposición del dominio BH3 de BAD (81). Existe evidencia de que varias cinasas son capaces de fosforilar e inactivar BAD, en especial la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) que es una cinasa específica para BAD en ser 112 (82).

Por otra parte BCL-2 es también fosforilado *in vivo* y esta modificación ha demostrado que afecta su actividad antiapoptótica (83-85).

Fragmentación

Siguiendo un tratamiento con TNF α o FAS, BID es fraccionada en su amino terminal por la caspasa-8 (86). El rompimiento de BID citosólico genera un fragmento de la parte carboxilo terminal, que se trasloca a la mitocondria. Este fragmento de BID (tBID) se inserta dentro de la membrana y se ha observado que esto es requerido para la liberación de citocromo c de la mitocondria (86)

También la remoción del dominio amino terminal de BID o BAX aumenta su capacidad para llegar a la mitocondria, lo que sugiere que esos dominios actúan como inhibidores de la apoptosis. Gracias a la resolución de la estructura tridimensional de BID, se puede ahora postular que el dominio amino terminal se encuentra impidiendo la exposición del dominio BH3, el cual se ha visto que tiene el potencial apoptótico, así cuando el dominio amino terminal es fragmentado, se expone el dominio BH3 y la molécula ejerce su acción apoptotica (81)

Transcripción

Existe evidencia de que los miembros proapoptóticos de la familia BCL-2, que son constitutivamente activos, pueden ser transcripcionalmente reguladas. Para disminuir su toxicidad en células sanas ellos podrían ser transcripcionalmente silenciosos, pero en respuesta a un estímulo de muerte selecto, las células podrían iniciar su transcripción (87).

Se ha observado que en ocasiones BAX parece ser transcripcionalmente responsivo a una inducción por p53 (87) Y esto también se ha observado para genes como BCL-XL (88), MCL-1 (89), A-1 (90) y en raras ocasiones BCL-2 (91).

Las proteínas de la familia BCL-2 regulan la liberación de citocromo c de la mitocondria. Fue encontrado que BAX puede inducir directamente la liberación de citocromo c de mitocondrias aisladas (92,93). En contraste, BCL-2 previene la liberación de citocromo c en células que vienen a apoptosis, pero también cuando BCL-2 es coadicionado con BAX en mitocondrias aisladas. De esta manera se piensa que BCL-2 puede actuar inhibiendo la inserción de BAX en la mitocondria o inhibiendo directa o indirectamente la actividad que tiene BAX para formar canales (94,95).

Se han propuesto dos modelos para explicar como BAX produce la liberación de citocromo c. El primero involucra la apertura de un megacanal mitocondrial, llamado poro de transición de la permeabilidad (PTP). Siguiendo a la apertura del PTP, el agua y solutos pueden entrar a la mitocondria. Esta puede entonces hincharse y su membrana externa romperse, originando la liberación de citocromo c y otras proteínas. El segundo modelo involucra la apertura de un canal específico en la membrana mitocondrial externa. Se ha observado que el PTP está compuesto de varias proteínas, incluyendo, hexocinasa, creatíncinasa mitocondrial, un canal aniónico dependiente de voltaje (CADV) presente sobre la membrana externa y en la membrana interna un translocador de nucleotidos (TAN) y en la matriz, ciclofilina D (94). Existen resultados que indican que la familia de proteínas BCL-2 se une a el CADV para regular el potencial de membrana mitocondrial y liberar citocromo c durante la apoptosis (94). Estos resultados fueron demostrados en liposomas, donde BAX y BAK originaban que el citocromo c pasara a través del CADV mientras que BCL-XL prevenia este paso. BCL-2 previene la apertura del PTP incrementando el flujo de protones de la matriz, lo que inhibe la respiración mitocondrial (sólo cuando la mitocondria está estresada) (95). La disminución de la respiración mitocondrial puede disminuir la

producción de radicales libres, lo que puede explicar las propiedades antioxidantes que previamente han sido atribuidas a BCL-2 (96,97)

EFACTORES DE MUERTE

Muchos de los cambios observados cuando las células están en apoptosis, incluyendo la degradación internucleosomal de ADN comúnmente observada y las características alteraciones morfológicas, reflejan un fraccionamiento proteolítico selectivo de varios polipéptidos intracelulares, originado por una serie de cisteín proteasas que son activadas específicamente en células apoptóticas y comúnmente llamadas caspasas (98). Las caspasas son altamente conservadas a través de la evolución y pueden ser encontradas desde humanos hasta insectos y nemátodos (98-100) Cerca de una docena de caspasas han sido identificadas en humanos y algunas de ellas han sido involucradas en la apoptosis (98,101)

Todas las caspasas conocidas poseen un sitio activo de cisteína y degradan substratos en los enlaces Asp-Xxx (es decir después de residuos de ácido aspártico), la especificidad de las caspasas hacia distintos substratos está dada por los cuatro residuos hacia el N-terminal del sitio de ruptura (102)

Al igual que muchas otras proteasas, las caspasas son sintetizadas como zimógenos enzimáticamente inertes. Estos zimógenos están compuestos de tres dominios un heterodímero compuesto por un prodominio N-terminal y los dominios p20 y p10 y dos sitios activos (98).

¿Cómo activar una caspasa?

Se han descrito tres mecanismos generales de activación de caspasas

Procesamiento por una caspasa río arriba.

Se ha reportado que muchas caspasas son activadas por fragmentación proteolítica del zimógeno entre los dominios p20 y p10 y usualmente también entre el prodominio N-terminal y el dominio p20, todos estos fraccionamientos ocurren en sitios Asp-X que son sitios substrato para las caspasas, sugiriendo esto, la posibilidad de una activación autocatalítica (102). Así, el método más simple para activar una caspasa sería exponerla a otra previamente activada. Esta estrategia de cascada para la activación es usada por las células para la activación de las caspasas -3, -6 y -7 (102)

El método de cascada es muy usado para amplificar e integrar señales proapoptóticas, pero no puede explicar como la primera caspasa río arriba puede ser activada

Mecanismo de proximidad inducida.

La caspasa-8 es la iniciadora clave en la vía de receptores de muerte. Por arriba de la unión del ligando, receptores de muerte tales como CD95 (Apo-1/Fas) se agregan y forman complejos de señalización unidos a membrana. Esos complejos entonces reclutan, a través de proteínas adaptadoras, varias moléculas de procaspasa-8, resultando en una alta concentración local del zimógeno. El modelo de proximidad inducida postula que bajo esas condiciones de amontonamiento, la baja actividad intrínseca como proteasa de la procaspasa-8 (103) es suficiente para permitir que las moléculas de proenzima se fragmenten y activen mutuamente. Experimentos que apoyan este modelo han mostrado

que el amontonamiento forzado de zimógenos es claramente suficiente en muchos casos para activar caspasas (104)

Mecanismo de asociación con una subunidad reguladora.

El mecanismo de activación más complejo que se ha descrito hasta la fecha, es aquel usado por la procaspasa-9. A diferencia de otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa-9 tiene sólo un efecto menor en la actividad catalítica de la enzima (105,106). Más bien, el requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con un cofactor llamado Apaf-1 (105).

Apaf-1 fue identificado como una de las dos proteínas que son requeridas para la activación de la caspasa-9, la otra es el citocromo c (107). Inicialmente se creía que Apaf-1 era requerida sólo transitoriamente para la activación de la caspasa-9, pero ahora el complejo Apaf-1/caspasa-9 representa la verdadera forma activa de la caspasa-9 (105). Así Apaf-1 es una subunidad reguladora esencial de una holoenzima de caspasa-9. Esta holoenzima (referida como el apoptosoma) es un complejo muy grande que posiblemente contiene varias proteínas adicionales (108-110).

En resumen, las caspasas efectoras son usualmente activadas proteolíticamente por una caspasa río arriba, mientras que las caspasas iniciadoras son activadas a través de interacciones reguladas proteína-proteína aunque actualmente el mecanismo molecular que media la activación de las caspasas iniciadoras no es muy claro.

Las caspasas que contienen prodominios largos presentan en este un módulo de interacción proteína-proteína, el cual ayuda a estas a unirse y asociarse con sus reguladores río arriba. Las caspasas -8 y -10 contienen un dominio efector de muerte (DED), mientras que las caspasas -2 y -9 contienen un dominio de activación y reclutamiento de caspasas.

(CARD). Esos dos dominios comparten una muy pequeña identidad de secuencia, pero tienen estructuras tridimensionales muy similares, que consisten de seis α -hélices arregladas en una configuración llave griega (111) El mismo pliegue es también encontrado en el dominio de muerte, un tercer módulo de interacción de proteínas presente en varios reguladores de apoptosis río arriba, tales como CD95 y el adaptador molecular FADD (112)

Fragmentación de ADN.

Las caspasas -3, -6 y -7 son las efectoras mejor caracterizadas hasta la fecha Una vez activadas, estas enzimas, son capaces de fragmentar la gran mayoría de polipéptidos en células apoptóticas (98) siendo la caspasa-3 la que inicia el proceso de fragmentación de ADN.

Como se mencionó anteriormente, las caspasas -8 y -9 son las caspasas iniciadoras mejor identificadas y su activación es el resultado de dos mecanismos o vías de activación muy distintas Ambas vías resultan en la activación río abajo de la caspasa-3, la cual, a su vez, activa una ADNasa llamada CAD, que preexiste en las células como un complejo inactivo que contiene una subunidad inhibidora llamada ICAD (113)

La activación de CAD ocurre cuando la caspasa-3 fragmenta la subunidad inhibidora del complejo, lo que resulta en la liberación y activación de la subunidad catalítica (113-114) Esta nucleasa corta el ADN genómico entre los nucleosomas para generar fragmentos largos que corresponden a múltiplos de aproximadamente 180pb Los oligonucleótidos resultantes de la fragmentación poseen un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3' (114)

La fragmentación de sustratos específicos mediada por caspasas, también explica las demás manifestaciones características de la apoptosis, por ejemplo, la fragmentación de las laminillas nucleares es requerida para que se lleve a cabo el encogimiento nuclear (115). El encogimiento celular es causado por la fragmentación de proteínas del citoesqueleto tales como la fodrina y la gelsolina (116). Existen cerca de 100 sustratos adicionales de las caspasas que han sido reportados durante los últimos años. La **tabla 1** resume algunos de ellos

TABLA 1 Polipéptidos fragmentados durante la apoptosis (98).

| Polipéptidos | Caspasa responsable | Efecto propuesto |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Proteínas citoplásmicas | | |
| Gelsolina | 3 | Rompimiento de actina |
| Fodrina | 3 | Encogimiento de membrana plasmática |
| β -Catenina | 3 | Disminución de contacto célula-célula |
| Proteínas nucleares | | |
| Laminillas A y B1 | 6 | Desensamble de laminas nucleares |
| NuMA | 3, 6 | Cambios en la envoltura nuclear |
| Proteínas HnRNP | 3 | Disminuye el procesamiento de ARN |
| mdm2 | 3, 6, 7 | Silenciador de unión a p53 |

ABLA 1 continuación

| olipéptidos | Caspasa responsable | Efecto propuesto |
|--|----------------------------|---|
| Proteínas envueltas en el metabolismo y reparación de ADN | | |
| ARP | 3, 7, 9 | Disminuye síntesis de poli(ADP-ribosa) |
| Topoisomerasa I | 3 | Desconocido |
| Proteínas envueltas en la transducción de señales y expresión de genes | | |
| Prointerleucina-1 β | 1 | Mediador clave de inflamación |
| NF κ Bp50, p65 | 3 | Disminuye transcripción |
| Proteína activadora de Ras GTPasa | 3 | Inactivación de señales de supervivencia de receptores extracelulares |
| Proteínas reguladoras de la apoptosis | | |
| Bcl-2 | ? | Genera fragmento proapoptótico |
| Bcl-XL | 1, 3 | Genera fragmento proapoptótico |
| Bid | 8 | Genera fragmento proapoptótico |
| CAD | 3 | Libera CAD activo |

Tabla 1. Tomada de Earnshaw, W C Et al (98).

Inhibidores de la apoptosis

La vía apoptótica contiene un número de pasos de amplificación y retroalimentación que aseguran que una célula se decida de lleno a morir o se abstenga completamente de la muerte. Esta retroalimentación positiva requiere la presencia de amortiguadores o moduladores, ya que la más pequeña perturbación podría dirigir a una célula a activar de lleno la maquinaria apoptótica. De esta manera, las vías apoptóticas mitocondrial y de los receptores de muerte puede ser modulada por los IAPs, (proteínas inhibidoras de la apoptosis) polipéptidos altamente conservados que selectivamente inhiben la actividad y activación de varias caspasas (117). Por ejemplo cIAP1 y 2, inhiben la habilidad de las caspasas -8 y -9 para activar a las otras caspasas efectoras. La vía de receptores de muerte además contiene otros niveles de regulación, por ejemplo, el polipéptido SODD (silenciador del dominio de muerte) se une a un dominio intracelular de TNFR1 y previene su oligomerización espontánea en ausencia de ligando (118). Para la vía de Fas, la interacción entre FADD y procaspasa-8 es regulada por FLIP, (proteína inhibidora semejante a Flice) una molécula que contiene un prodominio similar al de la procaspasa-8 pero carece de un sitio activo (98).

Existen además inhibidores de los IAPs, tales como los recientemente identificados Smac (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria) y DIABLO (proteína de unión directa a IAP con bajo pI). Smac/DIABLO se une a los miembros de la familia IAP y neutraliza su actividad antiapoptótica (117).

Fagocitosis de células apoptóticas

La fase final de la deleción celular *in vivo* es la fagocitosis veloz y segura de células no deseadas (119) La remoción de células apoptóticas por fagocitos, puede suprimir la inflamación y modular la respuesta inmune (119)

Las células que se encuentran en apoptosis pueden manifestar una serie de marcas o señales que indican que pueden ser fagocitadas Algunas de estas señales están bien caracterizadas, tales como la exposición de fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en la membrana interna o cambios en azúcares de superficie detectados por fagocitos (120) Existen otros marcadores, que aún están poco definidos, como los sitios que unen moléculas puente presentes en el fluido extracelular, las cuales incluyen a C1q, el primer componente del complemento (120)

Después de que las células apoptóticas son reconocidas por los macrófagos, sobreviene la fagocitosis La fagocitosis de células invadidas por parásitos normalmente origina que los macrófagos secreten moléculas capaces de iniciar una respuesta inflamatoria, pero se ha observado que en la ingestión de cuerpos apoptóticos esto no ocurre, sino lo contrario, se suprime la secreción de moléculas como el TNF- α (121) y se ha observado además que se induce la liberación del factor de crecimiento transformante- β 1, una citocina inmunosupresiva y anti inflamatoria (121)

Por estos hechos es que actualmente existe la búsqueda de fármacos contra el cancer que activen la apoptosis para evitar un mayor daño en los tejidos circundantes al tumor

7. METODOLOGÍA

1 MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL HELA

Todos los procedimientos se realizan en zona aséptica (campana de flujo laminar) y el material utilizado en la manipulación de medio de cultivo o líneas celulares debe ser estéril

1.1 Descongelación de la línea mantenida en nitrógeno líquido

- a) Se lleva el medio de cultivo a una temperatura de 37 °C aproximadamente mediante baño maría y se colocan 3.5 mL en una caja Petri de 5 cm previamente rotulado
- b) Se saca el criotubo que contiene a las células y se descongela mediante agua tibia o frotándolo con las manos
- c) Se agrega el contenido del criotubo en la caja petri con el medio y se distribuye el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incuba a 37 °C, 5% de CO₂ alrededor de dos horas o hasta que por observación al microscopio se observe que las células se hallan adherido a la superficie de la caja Petri y se elimina el medio de cultivo cambiándolo por medio fresco

1.2 Propagación de la línea celular

1.2.1 Células en confluencia escasa

- a) Se aplican movimientos circulares suaves a la caja y se decanta el medio de cultivo
- b) Se lava la caja con PBS-EDTA y se decanta

- c) Se adiciona un medio de cultivo fresco previamente atemperado y se incuba a 37 °C, 5% de CO₂ hasta obtener la confluencia deseada

1.2.2. Células en confluencia elevada

- a) Se realizan los pasos de los incisos a y b de la sección 1.2.1. Se repite dos veces el paso del inciso b si la cantidad de detritos es elevada
- b) Se adiciona PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular y se incuba a 37 °C por 15 minutos
- c) Se desprenden las células con una pipeta Pasteur vertiendo el PBS-EDTA sobre la monocapa hasta observar turbidez
- d) Se disgregan las células desprendidas succionando y expulsando suavemente el PBS-EDTA hasta que por observación microscópica se compruebe que se han obtenido células individuales
- e) Se adiciona una alícuota de la suspensión celular en una caja Petri con medio de cultivo previamente atemperado y se distribuyen las células con movimientos circulares suaves
- f) Se deja sedimentar a las células 10 minutos en una superficie plana horizontal y posteriormente se incuban a 37 °C, 5% de CO₂

1.3 Congelamiento de la línea celular

Para realizar este procedimiento se requiere de un cultivo celular en confluencia elevada (>80%)

- a) Se realizan los pasos de los incisos a hasta d de la sección 1.2.2
- b) La suspensión celular se colecta con una pipeta Pasteur en un tubo y se centrifuga a 2000 r.p.m 5 minutos
- c) Se decanta el PBS-EDTA y se resuspende el botón celular con el PBS-EDTA residual
- d) Se adicionan 4.5 mL de medio de congelamiento por cada caja de cultivo cosechada homogenizando la suspensión celular
- e) Se alícuota la suspensión celular en criotubos y se congelan en posición vertical a -70°C por 24 horas
- f) Se introducen los criotubos en nitrógeno líquido

2 EXPOSICIÓN AL COMPUESTO III JLNZ-106

Todos los procedimientos se realizan en zona aséptica, excepto el conteo celular y el material utilizado en la manipulación de medio de cultivo o líneas celulares debe ser estéril

Para realizar este procedimiento se requiere de un cultivo celular en confluencia elevada

- a) Se realizan los pasos de los incisos a y b de la sección 1.2.1. Se repite dos veces el paso del inciso b si la cantidad de detritos es elevada
- b) Se adiciona PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular y se incuba a 37°C por 15 minutos.

- c) Se desprenden las células con una pipeta Pasteur vertiendo el PBS-EDTA sobre la monocapa hasta observar turbidez.
- d) Se disgregan las células desprendidas succionando y expulsando suavemente el PBS-EDTA hasta que por observación microscópica se compruebe que se han obtenido células individuales
- e) Se homogeniza la suspensión celular y se cuenta en la cámara de Neubauer
- f) Se agregan 1×10^6 células a una caja Petri de 10 cm que contenga medio de cultivo previamente atemperado y se incuba a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 horas
- g) Se agrega el compuesto III JLNZ- a una concentración de 70µM
- h) Se homogeniza la concentración del compuesto en un agitador a 200 r p m. por 5 minutos.
- i) Se incuba a 37 °C, 5% de CO₂ durante el tiempo requerido de exposición.

3. CONTEO CELULAR EN LA CÁMARA DE NEWBAUER

- a) Limpiar la cámara con etanol al 70% secarla y colocarla en una superficie horizontal
- b) Se toman 100 µL de la suspensión celular, se colocan en la cámara y se deja reposar 3 minutos para que las células sedimenten
- c) Se coloca la cámara sobre el microscopio y se cuentan las células que se encuentren en los ocho cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos siguiendo el siguiente criterio: se cuentan las células que se encuentren dentro de los 16 cuadros

que comprenden a cada cuadrante. Si hay células que se encuentren en el límite de dos cuadros, se toman dos lados de tal manera que formen una L invertida, las células que se encuentren entre estos lados solamente se adicionan al cuadro que se estaba contando, con el fin de evitar que una célula se cuente en dos o más cuadros.

- d) Se obtiene el promedio de la cuenta en los 8 cuadrantes y se aplica la siguiente fórmula

$$\text{Número de células/mL} = \text{promedio} * 10^4$$

4 CITOMETRÍA DE FLUJO Modificada de (130)

4.1 Preparación de las muestras

- a) Se despegan las células tratadas y no tratadas con 3 mL de PBS-EDTA durante 10 minutos y se pasan a tubos Falcon de 15 mL.
- b) Se centrifugan las muestras a 2000 r.p.m. durante 5 minutos.
- c) Se decanta totalmente el PBS-EDTA y se adiciona al paquete de células 10 mL de etanol al 70%.
- d) Se almacenan las células en suspensión a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (fijación). Las células fijadas deben ser utilizadas durante las próximas dos semanas.
- e) Se centrifugan las células fijadas a 2500 r.p.m. durante 5 minutos y el etanol se decanta.
- f) Se pasan los pellets celulares a tubos Eppendorf de 0.5 mL adicionando 40 μL de un amortiguador de fosfato-citrato.

- g) Se deja en reposo 40 minutos durante 40 minutos y posteriormente se transfiere el sobrenadante a nuevos tubos. El sobrenadante contiene ADN de bajo peso molecular y puede ser utilizado para una electroforesis en agarosa.
- h) Los pellets celulares se transfieren a tubos de ensayo y se les adicionan 2 mL de una solución de 5 µg/mL de bromuro de etidio y Triton X-100 durante 5 minutos.
- i) Se adicionan 10 microlitros de ARNasa a una concentración de 1 mg/mL.
- j) Se mide la fluorescencia de las muestras en un citómetro de flujo.

5. DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR *IN SITU* TÉCNICA DE TUNEL

Preparación de las muestras

- a) Se prepara una caja Petri de 10 cm con porta objetos circulares en el interior y se agregan 10 mL de medio de cultivo.
- b) Se agregan 1×10^6 células Hela y se dejan crecer 24 horas. Después de este tiempo se exponen al compuesto a los tiempos necesarios (24 y 48 h).

Fijación de las muestras

- c) Se repiten los pasos a y b de la sección 1.2, cuidando que no se caigan los cubre objetos que contienen células adheridas.
- d) Se secan los cubre objetos por medio de vacío y transferirlos individualmente a cajas Petri de 5 cm.

- e) Se fijan las muestras secas con una solución recién preparada de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente

Bloqueo de la peroxidasa endógena y permeabilización celular

- f) Se lavan las muestras con PBS y se incuban con la solución bloqueadora (3% H₂O₂ en metanol) por 10 minutos a temperatura ambiente
- g) Se lavan las muestras con PBS y se incuban en la solución permeabilizante (Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1%) durante 2 minutos en hielo (4°C)

Marcaje

- h) Se lavan las muestras con PBS y se seca el área alrededor de la muestra
- i) Se adhieren 50 microlitros de la mezcla de reacción TUNEL sobre cada muestra y se tapan con un cubre objetos cuadrangular para evitar la evaporación y asegurar un esparcimiento homogéneo de la mezcla de reacción
- j) Se incuban en una cámara humidificadora (incubadora) durante 60 minutos a 37°C
- k) Se lavan las muestras tres veces con PBS
- l) Se analizan las muestras bajo un microscopio de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación en el rango de 450-500 nm y la detección se hace en el rango de 515-565 nm (verde)

Controles

Control negativo. Se incuban las muestras fijadas y permeabilizadas en 50 microlitros/muestra de solución de marcaje (sin enzima) en lugar de la mezcla de reacción TUNEL y se procede como en los pasos j, k y l de la sección de marcaje.

Control positivo. Se incuban las muestras fijadas y permeabilizadas con DNAsa I (1mg/mL) a temperatura ambiente durante 10 minutos con el fin de producir una ruptura en el ADN. Posteriormente se repiten los pasos a partir del inciso h de la sección de marcaje.

6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT Modificada de (131)

Extracción de proteínas

- a) Se obtienen cultivos de células HeLa con 8, 24, 36 y 48 h de exposición al compuesto III JLNZ-106 como se indica en la sección 2
- b) Se decanta el medio de cultivo y se enjuaga dos veces con PBS.
- c) Se agrega 1mL de amortiguador de lisis triple detergente y se incuba a 4° C durante 5 minutos
- d) Se despegan las células utilizando una pipeta Pasteur y la suspensión se transfiere a tubos de ensayo
- e) Con la ayuda de un homogenizador se lisa a las células en suspensión

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Curva patrón

- a) Se pipetea 1, 2.5, 5, 10 y 20µL de una solución estándar de albúmina 1mg/mL en tubos de ensayo y se completa el volumen a 800µL con agua destilada
- b) Se agrega a cada tubo 200µL del reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se agitan las muestras
- c) Se lee en un espectrofotómetro a 595 nm con el programa para el método de Bradford, utilizando un blanco con 800µL de agua destilada y 200µL del reactivo de Bradford.

Para la muestra se pipetea 2µL de cada extracto proteínico, se completa el volumen a 800µL con agua destilada y se siguen los pasos de los incisos b y c de la curva patrón

Electroforesis

- a) Se pipetea un volumen equivalente a 100 μ g de proteína para cada muestra en tubos eppendorf de 0.5 mL y se agrega un volumen igual de buffer de carga
- b) Se calientan las muestras en un baño maría a ebullición durante 5 minutos y se cargan en un gel de poliacrilamida al 12%
- c) Se corre la electroforesis a 80 Volts hasta que el frente llegue a 0.5 cm antes de salir del gel.

Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda de transferencia durante toda la noche a 30 Volts

Bloqueo e incubación con los anticuerpos

- a) Se saca a la membrana de la cámara de transferencia y se incuba 2 h con la solución bloqueadora.
- b) Se decanta la solución bloqueadora y se pone el anticuerpo primario (anti BAX o anti actina) diluido 1:150 en TBS con leche al 1% y se incuba a temperatura ambiente durante 2 h.
- c) Se decanta la solución con el anticuerpo primario, la cual se guarda en refrigeración a 4° C para ser reutilizada, y se hacen tres lavados de 5 minutos c/u con una solución de TBS-Tween al 0.1%
- d) Se decanta la solución de lavado, se agrega el anticuerpo secundario (anti IgG-HRPP) diluido 1:1500 en TBS con leche al 1% y se incuba a temperatura ambiente durante una hora

Revelado

Todos los pasos siguientes se realizan en un cuarto de revelado

- a) Se repiten los pasos del inciso c de la sección de bloqueo e incubacion con los anticuerpos y la membrana es incubada en con 4mL de los reactivos para quimioluminiscencia durante 2 min
- b) Se escurre la membrana, se envuelve en Plástipack^R. se pone en contacto con una placa para revelado fotográfico durante 2 min y esta se revela y se fija

Análisis de las bandas obtenidas

Las placas fotográficas se digitalizan con ayuda de una computadora personal y las bandas obtenidas son analizadas densitométricamente utilizando el programa Scion Image versión 3.0. Las lecturas reportadas para cada banda están dadas en unidades arbitrarias que el programa asigna

7 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Medio de cultivo

Medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

| | Cantidad |
|---|-----------------------------|
| Medio D-MEM (GIBCO) | 1 sobre para disolver en 1L |
| Suplementado con | |
| *Glutamina (GIBCO) | 2 mL |
| Hepes (SIGMA) | 22 g |
| Insulina (LILLY) | 10 mL |
| MEM solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO) | 10 mL |
| Suero fetal bovino (GIBCO) | 100 mL |
| Antibiótico antimicótico (GIBCO) | 10 mL |

Revelado

Todos los pasos siguientes se realizan en un cuarto de revelado

- a) Se repiten los pasos del inciso c de la sección de bloqueo e incubación con los anticuerpos y la membrana es incubada en con 4mL de los reactivos para quimioluminiscencia durante 2 min
- b) Se escurre la membrana, se envuelve en Plástipack^R . se pone en contacto con una placa para revelado fotográfico durante 2 min y esta se revela y se fija

Análisis de las bandas obtenidas

Las placas fotográficas se digitalizan con ayuda de una computadora personal y las bandas obtenidas son analizadas densitométricamente utilizando el programa Scion Image versión 3 0. Las lecturas reportadas para cada banda están dadas en unidades arbitrarias que el programa asigna.

7 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Medio de cultivo

Medio D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium).

| | Cantidad |
|---|-----------------------------|
| Medio D-MEM (GIBCO) | 1 sobre para dissolve en 1L |
| Suplementado con | |
| *Glutamina (GIBCO) | 2 mL |
| Hepes (SIGMA) | 2 2 g |
| Insulina (LILLY) | 10 mL |
| MEM solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO) | 10 mL |
| Suero fetal bovino (GIBCO) | 100 mL |
| Antibiótico antimicótico (GIBCO) | 10 mL |

| | |
|-----------------------------|-------|
| *NaHCO ₃ (BAKER) | 3.7 g |
| Piruvato de sodio (GIBCO) | 10 mL |

*Estos elementos se adicionan solo si el medio de cultivo en polvo no los contiene

- 1 - Disolver el contenido de un sobre en 700 ml de agua desionizada estéril.
- 2 - Adicionar todos los suplementos excepto el suero fetal bovino. La solución se agita hasta disolver completamente las sales
- 3.- Ajustar el pH a 7.4 ± 0.3
- 4 - Aforar a 900 mL con agua desionizada estéril
- 5.- Esterilizar la solución por filtración con membrana Millipore de 0.45µ
- 6 - Completar el medio con 100 mL de suero fetal bovino

Medio de congelamiento A para la línea celular HeLa

- 1 - Se utiliza medio D-MEM sin complementar con suero fetal bovino y se le adiciona 15% v/v de glicerol estéril.
- 2.- Este medio se guarda en recipientes estériles y se congela a -20° C.

Solución de PBS-EDTA

Para un litro de solución

| Componentes | Cantidad |
|----------------------------------|----------|
| NaCl | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 g |
| KCl | 0.2 g |
| EDTA | 0.37 g |
| Agua desionizada c.b.p | 1 L |

- 1.- Disolver las sales en 900 mL de agua desionizada
- 2.- Ajustar el pH a 7.4
- 3 - Aforar a 1 L con agua desionizada
- 4 - Alicuotar en recipientes limpios
- 5.- Esterilizar en autoclave a 15 lb/m² durante 15 minutos.

Solución de etanol al 70%

Para preparar un litro de solución

- 1 - Medir 700 mL de Etanol absoluto (BACKER)
- 2.- Aforar a 1L con agua destilada
- 3 _ Mezclar por agitación la solución
- 4 - Guardar a -20°C

Amortiguador PC (fosfato-ácido cítrico)

Para preparar 200 mL de solución

- 1 - Se hace una solución de Na_2HPO_4 0.2 M (13.39 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BACKER) en 250 mL de agua)
- 2.- Se hace una solución de ácido cítrico 0.1 M pH 7.8 (0.48 g de ácido cítrico (Merck) en 25 mL de agua)
- 3.- Se mezclan 192 partes de la solución 0.2 M de Na_2HPO_4 con 8 partes de ácido cítrico 0.1 M

Amortiguador de lisis (triple detergente)

| Componentes | concentración |
|------------------------|-----------------------------|
| Tris Cl pH 8.0 (SIGMA) | 50 mM |
| NaCl (BACKER) | 150 mM |
| Azida de sodio (SIGMA) | 0.02% |
| SDS (SIGMA) | 0.1% |
| PMSF (SIGMA) | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Aprotinina (SIGMA) | 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Triton (SIGMA) | 1% |

Gel al 12% de acrilamida-bisacrilamida

Separador

| | |
|------------------------------|-------------|
| Acrilamida-bisacrilamida 30% | 4 mL |
| Tris base (pH 8.8) | 2.5 mL |
| SDS 10% | 100 μ L |
| Agua | 3.33 mL |
| Persulfato de amonio 1g/mL | 50 μ L |
| TEMED | 10 μ L |

Concentrador

| | |
|------------------------------|-------------|
| Acrilamida-bisacrilamida 30% | 0.66 mL |
| Tris base (pH 6.8) | 1.25 mL |
| SDS 10% | 50 μ L |
| Agua | 3.0 mL |
| Persulfato de amonio 1g/mL | 25 μ L |
| TEMED | 2.5 μ L |

TBS

Para 500 mL de solución

| | |
|-----------|--------|
| Tris base | 3.03 g |
| NaCl | 4.38 g |

1 - Disolver las sales en 300 mL de agua destilada

2.- Ajustar el pH a 7.5

3 - Aforar a 500 mL con agua destilada

8. RESULTADOS

Cuantificación de apoptosis por citometría de flujo

Los resultados del análisis del ciclo celular y la apoptosis inducida en células HeLa por el dimetilsulfóxido (control de disolvente), el taxol (control positivo), y el derivado pirimídico de lactona sesquiterpénica (III JLNZ-106), se muestran en los histogramas de las figuras 3 y 4 y se resumen en la tabla 2.

Se utilizaron como control de disolvente, células HeLa tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) que fue el disolvente usado para preparar las soluciones del compuesto III JLNZ-106, con el fin de observar si al volumen utilizado en los experimentos (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo) no se presentaba actividad apoptótica.

Como se observa en la figura 3-A y 3-B el DMSO no tiene efecto apoptótico significativo sobre la apoptosis, al volumen utilizado ni a los tiempos de exposición a este (5 y 48 horas)

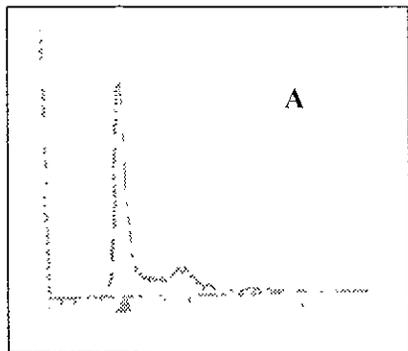
Como control positivo de la inducción de apoptosis, se utilizó taxol a una concentración de $25\mu\text{M}$. Como se resume en la tabla 2 el taxol tuvo un efecto apoptótico de 13.71% a las 24h de exposición y de 42.7% a las 48h, observándose un efecto despreciable a la 5h de exposición. A su vez también se observó un arresto del ciclo celular en la fase G2/M en donde un 82.65% de las células fueron encontradas después de 24h de exposición al compuesto, mientras que a 5h solo existían 35.27% de células en esta fase. Después de 48h de tratamiento se disminuyó el porcentaje de células en esta fase hasta un 37.73%. Se observa también que las células en fase S disminuyeron drásticamente su porcentaje de 36.31% a las 5h de tratamiento hasta un 0% a las 24 y 48h. Además de esto las células en

fase G1/G0 disminuyeron del 28.42% a las 5h hasta un 3.66% a las 24h y después aumentó su porcentaje hasta un 17% a las 48h

Cuando las células HeLa fueron tratadas con el compuesto III JLNZ-106 a una concentración de 70 μ M se obtuvieron los siguientes resultados

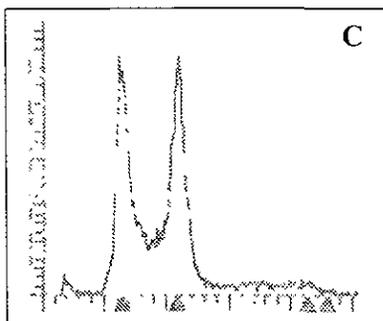
Como se observa en la tabla 2 el compuesto indujo la apoptosis del 4.56% de las células a las 24h y se aumentó drásticamente la cantidad de células en apoptosis hasta un 25% a las 48h, mientras que a 5h el efecto apoptótico fue despreciable. El análisis del ciclo celular muestra un aparente arresto de las células en las fases G0/G1 y G2/M. Las células en la fase G0/G1 disminuyeron su porcentaje de 45.40% a las 5h a un 39 y 30.50% a las 24h y 48h respectivamente. La mayor variación se dio en la fase S donde el porcentaje de células disminuyó de 40.41% a las 5h hasta un 8.2% a las 48h. El porcentaje de células en fase G2/M aumentó su porcentaje de 14.18% a las 5h hasta un 36.06% a las 48h

CONTROL (DMSO)

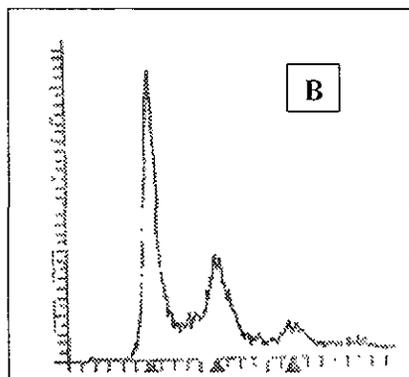


A

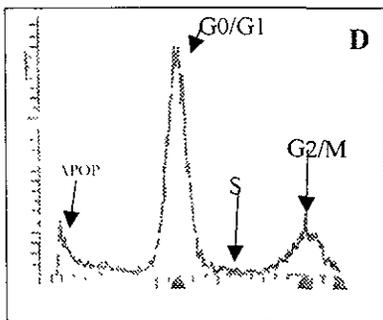
CONTROL POSITIVO (TAXOL)



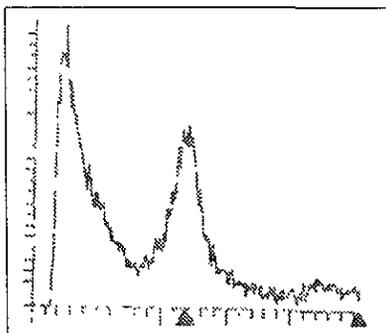
C



B



D



CONTENIDO DE ADN

Figura 3. Histogramas obtenidos de la citometría de flujo de células HeLa analizadas por fluorescencia de bromuro de etidio (contenido de ADN). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton - Dickinson, San José, CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA) Los histogramas A y B muestran el control de disolvente (DMSO) a las 5 y 24 h respectivamente. C, D y E control positivo (Taxol 25 μ M) a 5, 24 y 48h respectivamente

DERIVADO PIRIMÍDICO DE LACTONA SESQUITERPÉNICA III JLNZ-106

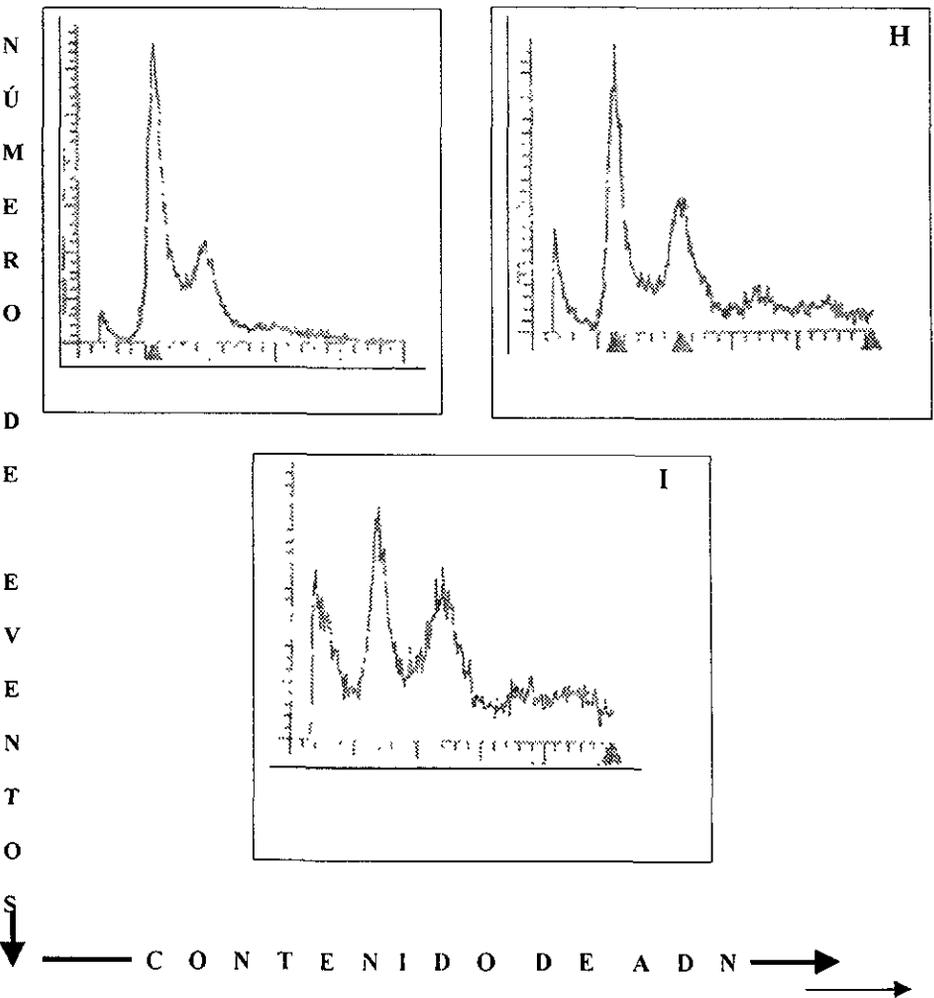


Figura 4. Histogramas obtenidos de la citometria de flujo de células HeLa analizadas por fluorescencia de bromuro de etidio (contenido de ADN). Las muestras fueron analizadas en un citometro de flujo (Becton - Dickinson, San Jose, CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Acqcyrc (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). G, H, I tratamiento con el compuesto III JLNZ-106 (70µM) a 5, 24 y 48 h respectivamente

PORCENTAJE DE CÉLULAS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

| | % G0/G1 | % S | % G2/M | % APOPTOSIS |
|-----------------|---------|-------|--------|-------------|
| CONTROL 5h | 63.36 | 30.99 | 5.65 | 0.03 |
| CONTROL 48h | 43.47 | 24.52 | 32.01 | 0.06 |
| TAXOL 5h | 28.42 | 36.31 | 35.27 | 0.56 |
| TAXOL 24h | 3.66 | 0.01 | 82.63 | 13.71 |
| TAXOL 48h | 17.00 | 0.00 | 37.73 | 42.7 |
| II JLNZ-106 5h | 45.40 | 40.41 | 14.18 | 0.10 |
| II JLNZ-106 24h | 39.00 | 28.87 | 32.14 | 4.56 |
| II JLNZ-106 48h | 30.50 | 8.20 | 36.06 | 25.00 |

TABLA 2 Análisis del porcentaje de células HeLa en apoptosis y en las diferentes fases del ciclo celular después de los diversos tratamientos. Los datos fueron analizados con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA)

Detección de apoptosis mediante la técnica de TUNEL

La figura 5-J muestra el control negativo de la técnica, preparado como se describe en la metodología experimental. En esta figura se observa a las células con sus características morfológicas normales.

La figura 5-K (control positivo) muestra células HeLa tratadas con ADNasa como se indica en la metodología experimental. Se observa una fluorescencia color amarillo extensa en los núcleos de las células, que demuestra degradación de ADN.

La figura 6-L muestra un control negativo de células HeLa tratadas con DMSO (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo) después de 48h de exposición. Se observan pocas células con la fluorescencia amarilla lo que indica una pequeña cantidad de células en apoptosis.

La figura 6-M muestra células HeLa tratadas con el compuesto II JLNZ-106 (70 μM) a las 5h de exposición. Se observan pocas células con la fluorescencia característica de apoptosis, pero se empieza a notar en la población un cambio en su morfología que pareciera ser un precipitado sobre su superficie.

La figura 7-N muestra un mayor número de células con ADN degradado y además ya es posible apreciar pequeños puntos fluorescentes dentro y fuera de las células semejantes a los descritos como cuerpos apoptóticos.

En la figura 7-O ya se observa una extensa cantidad de células apoptóticas y es mucho más evidente la presencia de cuerpos apoptóticos.

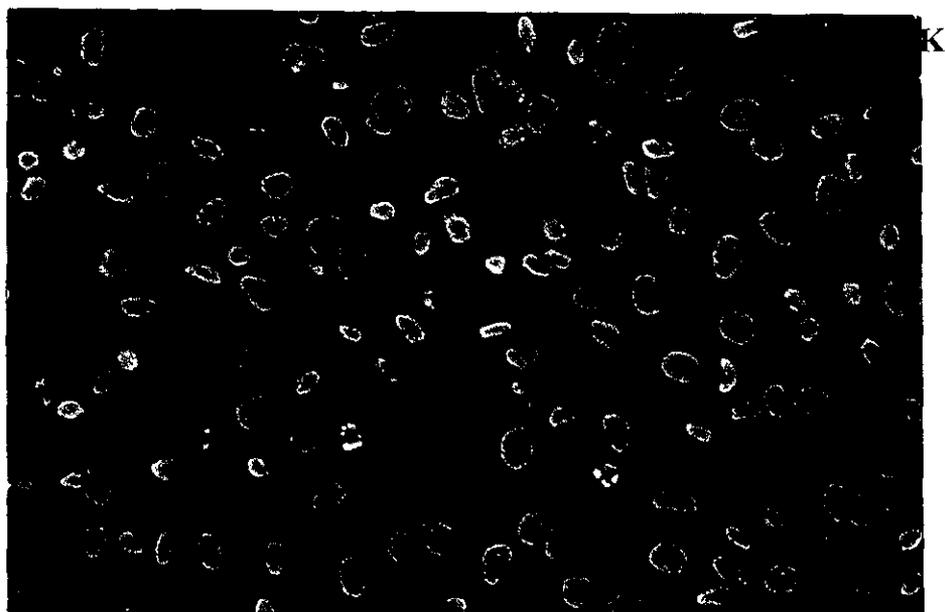


Figura 5 Técnica de TUNEL J control negativo de la técnica preparado como se describe en metodología experimental. Figura K control positivo células HeLa tratadas con ADNasa. La fluorescencia amarilla es indicativa de degradación del ADN

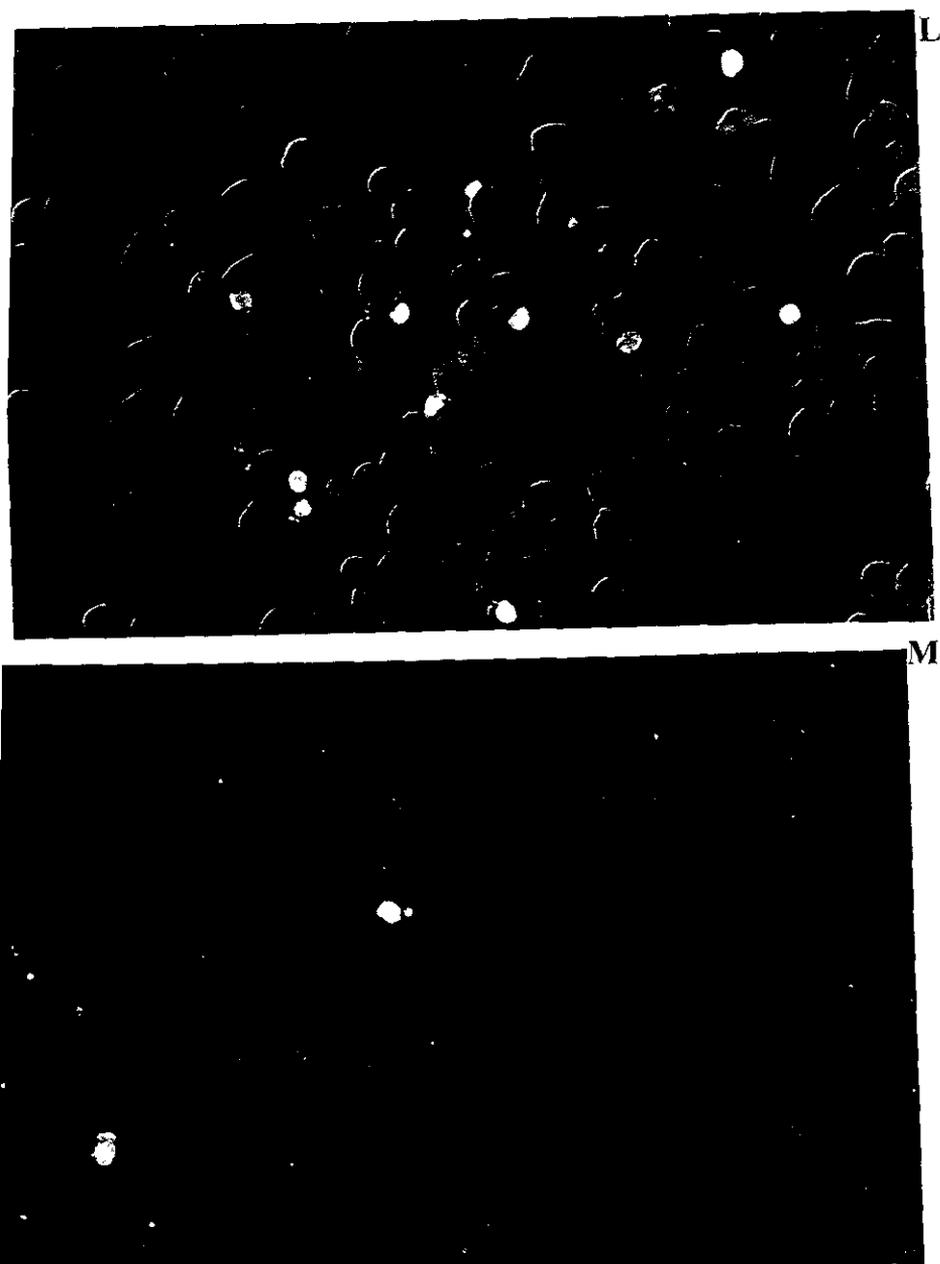


Figura 6. Técnica de TUNEL. L control de disolvente 48h M tratamiento con el compuesto III JLNZ-106 (70μM) 5h La fluorescencia amarilla es indicativa de degradación de ADN

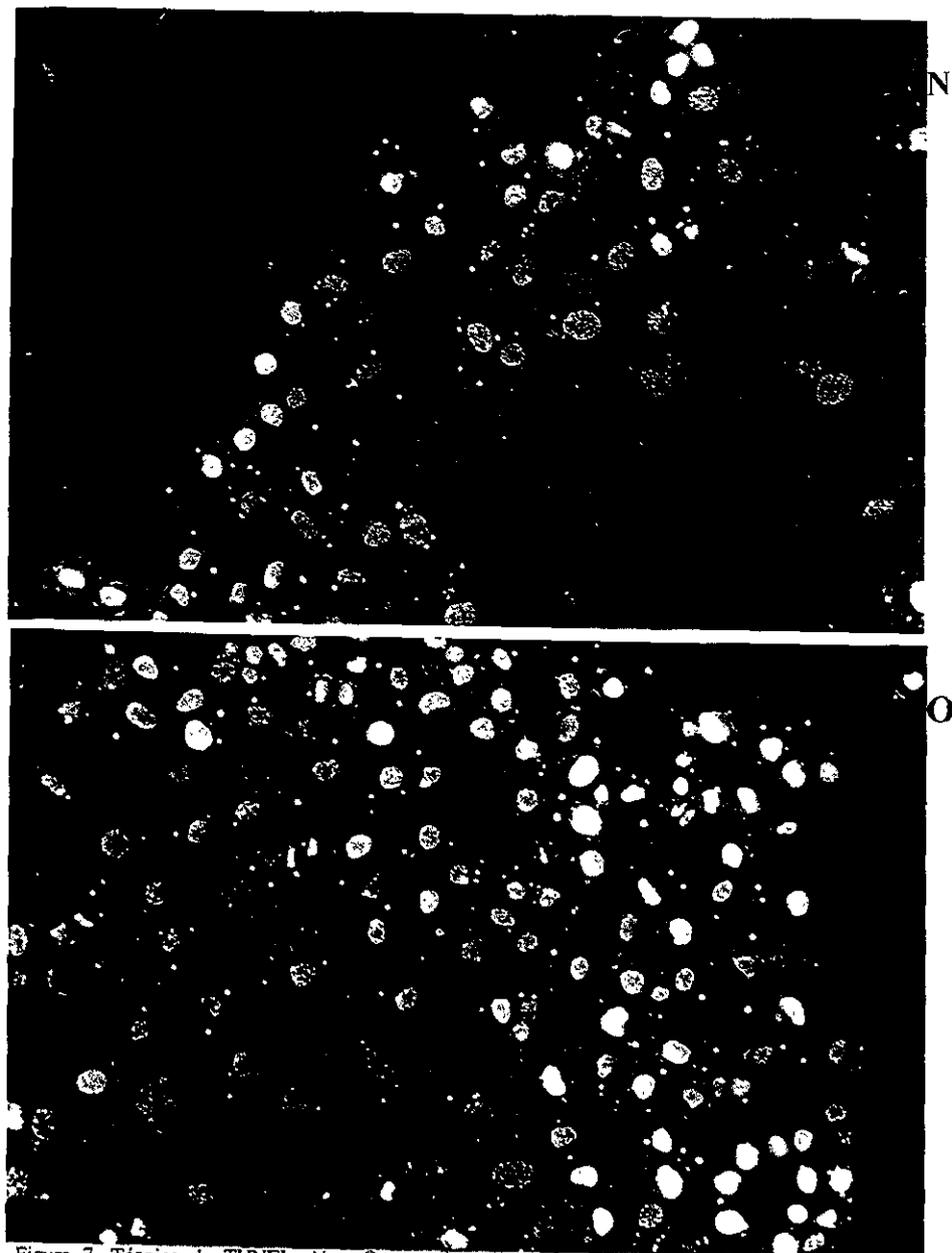


Figura 7. Técnica de TUNEL. N y O tratamiento con el compuesto III JLNZ-106 a las 24 y 48h respectivamente. La fluorescencia amarilla es indicativa de degradación de ADN. Los puntos amarillos dentro y fuera de las células indican la presencia de cuerpos apoptóticos.

Análisis de BAX por Western Blot

Para observar si existía una variación en la expresión de la proteína BAX se realizó un Western Blot de esta proteína, fueron cargados 75µg de proteína y los resultados fueron normalizados con β-actina.

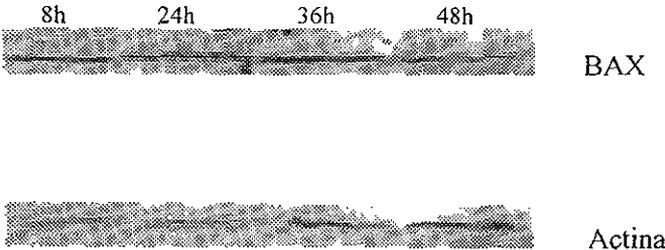
Los resultados se muestran en las figuras 8-1 y 8-2. La figura 8-1 muestra las bandas obtenidas para BAX y Actina de las células tratadas con el compuesto III JLNZ-106 y la figura 9 resume los resultados de la densitometría aplicada a estas bandas.

Los resultados muestran un índice BAX/actina de 0.8798 a las 8h, de 0.9042 a las 24h, de 1.1445 a las 36h y de 0.8385 a las 48h. Los resultados observados muestran un aumento en BAX dependiente del tiempo de exposición al compuesto III JLNZ-106 hasta las 36h, donde se presenta un máximo y después viene un decaimiento en los niveles de la proteína.

La figura 8-2 muestra las bandas obtenidas para BAX y Actina de las células tratadas con el disolvente. La figura 9 muestra los resultados de la densitometría aplicada a estas bandas.

Se obtuvo un índice BAX/actina de 0.6823 a las 8h, de 0.7608 a las 24h, de 0.7086 a las 36h y de 0.6211 a las 48h. Estos resultados muestran que el disolvente utilizado, no induce cambios significativos en los niveles de BAX.

1) COMPUESTO III JLNZ-106



2) CONTROL

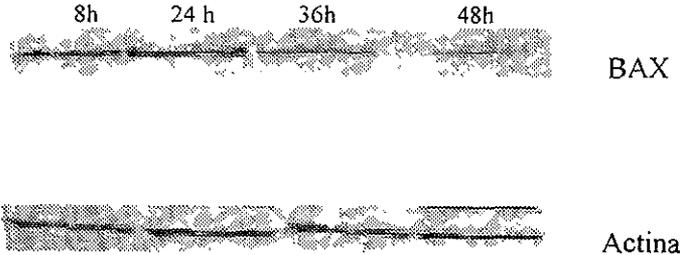


Figura 8 análisis de BAX por Western Blot. 1) proteínas extraídas de células Hela tratadas con el compuesto III JLNZ-106 (70µM) a diferentes tiempos.2) Control de disolvente a diferentes tiempos. Se muestran los resultados para las proteínas BAX y actina

EXPRESIÓN RELATIVA DE BAX

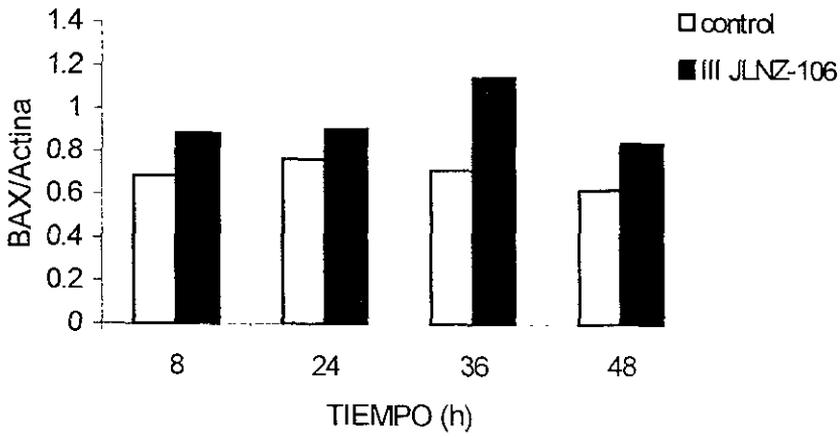


Figura Q expresión relativa de la proteína BAX en células HeLa. El análisis densitométrico fue llevado a cabo en el programa Scion Image

9. DISCUSIÓN

En las últimas cinco décadas, el tratamiento del cáncer ha dependido primordialmente del uso de la quimioterapia y la radiación. Estos tratamientos han tenido resultados muy positivos sobre varios padecimientos hematológicos y algunos tumores sólidos. Sin embargo, la mayoría de estos padecimientos han logrado ser resistentes o generar resistencia a estos tratamientos. La utilización de altas dosis de los compuestos quimioterapéuticos puede tener un modesto mejoramiento en la respuesta a estos agentes, pero en la mayoría de los casos, la efectividad de los tratamientos citotóxicos ha sido limitada por los efectos adversos de esos agentes sobre células y tejidos normales.

La evidencia obtenida en los últimos años ha establecido que muchos de los agentes utilizados en la quimioterapia contra el cáncer ejercen su efecto *in vitro* e *in vivo* iniciando el mecanismo de apoptosis. Así también la resistencia a la apoptosis ha emergido como una importante categoría de resistencia al tratamiento (132).

La investigación en apoptosis promete la identificación de nuevos blancos y el desarrollo de agentes quimioterapéuticos más específicos, que activen la maquinaria apoptótica en la célula (133).

En el presente trabajo se evaluó el posible efecto apoptótico de un derivado de lactona sesquiterpénica en la línea celular tumoral HeLa. Los resultados muestran que la inducción de apoptosis fue dependiente del tiempo de exposición al compuesto.

Los resultados de la citometría de flujo muestran una disminución en el porcentaje de células en fase S, lo que podría indicarnos que el proceso de síntesis fue detenido por la

inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de ADN o por un daño directo a éste por parte del compuesto III JLNZ-106

Así también el compuesto III JLNZ-106 ocasionó un arresto en el ciclo celular, tanto en G₀/G₁ como en G₂/M. Debido a que el ADN puede ser dañado en diferentes puntos del ciclo celular, múltiples “checkpoints” son requeridos para garantizar una estrategia de arresto en cada fase del ciclo. La literatura menciona que si el daño ocurre mientras el ADN se está replicando –como se observa a las 5h de tratamiento (40-41% de células en fase S)- las proteínas CHK1 y CHK2 son fosforiladas por ATM y pueden inhibir a las fosfatasa requeridas para la progresión G₁/S y G₂/M (134)

Por otra parte, también se sabe que después de un daño al ADN o del uso de antimetabolitos, se disminuye la concentración de nucleótidos y la síntesis de ADN y esto activa a p53, el cual activa transcripcionalmente a p21 y se origina un arresto en G₀/G₁ (135)

Los resultados obtenidos por la técnica de TUNEL muestran evidencias contundentes de que el compuesto está originando apoptosis, puesto que se observan algunas de las características presentes en una célula apoptótica, como son el encogimiento celular y más evidentemente, la formación de cuerpos apoptóticos

En el caso de las células tratadas con ADNasa, la fluorescencia es homogénea sobre todo el núcleo celular, indicativa de una degradación extensa y al azar del ADN, mientras que en las células tratadas con el compuesto, existe un patrón de fluorescencia “punteado”, indicativo de una degradación internucleosomal del ADN, además de un englobamiento de éste, dentro de fragmentos de membrana formando cuerpos apoptóticos

Se puede decir que la inducción en la expresión de BAX fue ocasionada por el derivado pirimídico de lactona sesquiterpénica, ya que la misma no se observó en las células control

El daño al ADN y la hipoxia pueden originar modificaciones postraduccionales que estabilizan y activan a la proteína p53. La estabilización y activación de p53 transcripcionalmente regula a la alta la expresión de genes como *p21*, *14-3-3* y *bax*, los cuales median señales que dirigen a la inhibición del crecimiento celular, la inducción de apoptosis o la reparación del ADN. Lo anterior refuerza el hecho de que el compuesto pudiera originar un daño directo al ADN pues la inducción de la expresión de BAX está íntimamente relacionada con la inducción de p53 y esta a su vez con un daño al ADN.

Se ha reportado que las lactonas sesquiterpénicas ejercen su efecto debido a que pueden sufrir la adición de Michel pues contienen un carbonilo α, β -insaturado. El compuesto III JLNZ-106 no contiene un grupo carbonilo α, β - insaturado sobre la α -lactona, pero si sobre la porción pirimídica

Quintero et al (127) previamente obtuvieron resultados con una serie de derivados pirimídicos de lactonas sesquiterpénicas, incluyendo al compuesto III JLNZ-106, que indican que una mayor lipofiliidad en los compuestos aumenta su actividad, lo que hace pensar que el compuesto necesita atravesar barreras hidrofóbicas para ejercer su efecto y que es posible que necesite llegar al núcleo

Se ha observado que los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 se encuentran en un estrecho equilibrio y que el rompimiento de este equilibrio puede originar apoptosis. En este caso, un aumento en la cantidad de la proteína BAX originaria que Bcl-2 el cual se ha reportado que evita la activación y dimerización de BAX, ya no

pueda evitar esta activación y así BAX puede dimerizarse y traslocarse a la mitocondria e inducir la liberación de citocromo c y la posterior activación de la caspasa-9 para iniciarse así la cascada de proteasas y se den las características apoptóticas

Se observa que hay un ligero aumento en la expresión de BAX desde las 24h de tratamiento, lo cual es congruente con la cantidad de células apoptóticas encontradas a las 24 y 36h, sin embargo, el aumento drástico en la expresión de BAX a las 36h explica el 25% de células en apoptosis encontrado a las 48h. La disminución de la cantidad de proteína BAX a las 48h puede explicarse, ya que a este tiempo las células ya muestran una gran degradación de sustratos por parte de las caspasas

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir

- 1) Que el compuesto III JLNZ-106 indujo apoptosis en la línea celular tumoral HeLa a una concentración de $70\mu\text{M}$
- 2) El máximo de apoptosis producida por este compuesto fue de 25% a las 48 h de exposición
- 3) La aparición de cuerpos apoptóticos observados en la técnica de TUNEL hacen evidente que se produjo apoptosis
- 4) El compuesto III JLNZ-106 ocasionó un incremento en la expresión de la proteína BAX, lo que podría indicar que el compuesto actúa directamente sobre un daño al ADN o sobre enzimas involucradas en su síntesis

11 REFERENCIAS

- (1) Rubenstein, E., Federmann, D D. editores Scientific American, Medicina, Vol. 5, sección 13 (Oncología) pp 11-17 (1997)
- (2) <http://www.ssa.gob.mx/dgei/vitales/cuadro4.html> Creada por SSA el 18/02/00 modificada el 28/03/01
- (3) IARC monographic. Tobacco's habits other than smoking betel-quid and areca-nut chewing, and some related nitrosamines *Eval. Carcinog. Risks human.*, 37 (1985).
- (4) IARC monografi Tobaco smoking *Eval. Carcinog. Risks human.*, 38 (1995).
- (5) Seltz, H K , Simanowski, U.A , Garzon, F T., Rideut, J M , Peters, T J , Koch, A., Berger, M.R, Ernecke, H., Marwald, M Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat *Gastroenterology* 98 406-413 (1990)
- (6) Howson, C P , Hiyama, T , Wynder, E.L Decline of gastric cancer. epidemiology of an unplanned triumph *Epidemiol. Rev* 8 1-27 (1986)
- (7) Sugimura, T An overview of cancer prevention *Eur. J. cancer prev.* 5 1-8 (1996)
- (8) May, W S., Sahyoun, N , Jacobs, S , Wolf, M y Cuatrecasas, P Mechanism of phorbol diester-induced regulation of surfase transferin receptor involves the action of activated protein kinase C and an intact cytoskeleton *J. Biol. Chem.* 260 9419 (1985)
- (9) Mihich, E "Cancer biology". Section Causes of cancer Panamericana 2 Edición, pp 250-271 (1995)
- (10) Berra E., Diaz-Meco, M T , Dominguez, I , Municio, M y Lozano, J Development of tumors in the rat ovary after transplattation in the spleen. *Cell* 74 555 (1993)
- (11) Solo, T , Turpeenniemi-Hujanen, T y Tryggvason, K Tumor Promoting phorbol esthers and cell proliferation stimulate secretion of basement menmbrene collagen-degrading metalloproteinase by human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260 8526 (1985).

- (12) Trevillyan, J.M., Perisic, O., Traugh, J.A. y Gorden, P. Insulin and phorbol ester-stimulated phosphorylation of ribosomal protein s6. *J. Biol. Chem.* 260. 341 (1985).
- (13) Grunberger, G., Zick, Y., Taylor, S.I. y Gorden, P. Tumor-promoting phorbol ester stimulates tyrosine phosphorylation in U-937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 2762 (1984)
- (14) Ghosh, S. y Baltimore, D. Activation *in vitro* of NF- κ B. *Nature.* 344. 678-682 (1990)
- (15) Montesano, R. y Orci, L. Tumor promoting phorbol esters induce angiogenesis *in vitro*. *Cell.* 42 469-471 (1985)
- (16) Hay A. Testing times for the tests. *Nature.* 350. 555-558 (1991)
- (17) Weinberg, R.A. Así se produce el cáncer. *Investigación y ciencia.* (1996).
- (18) Rubenstein, E., Federman, D.D. Editores: *Scientific American Medicine.* Vol 5, sección 15 (oncología), subsección III biopatología del cáncer (1994).
- (19) Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194: 23-27 (1976)
- (20) Schepartz, S.A. Introduction and historical background. William O. Foye, editor. *American chemical society.* Washington D.C. USA (1995)
- (21) Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duchinsky, R., Schnitner, R.J., Plevin, E., Scheiner, J. 5-FU a novel fluorine substituted purine. *Nature.* 179 663-666 (1957)
- (22) Pezzuto, J. Taxol production in plant cell culture comes of age. *Nature Biotech.* 14 1083 (1996)
- (23) Crossink, L., Carney, D.H. Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin, an epidermal growth factor. *Cell.* 27 341-350. (1981).
- (24) Tze-sing Huang, Chih-Hung Shu, Yee Chao, San-Na Chen y Li Li Chen. Activation of MAD2 checkprotein and persistence of cyclin B1/CDC1 activity associate with paclitaxel-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Apoptosis* 5: 235-241 (2000).

- (25) Scatena, C.D., Stewart, Z.A., Mays, D., Tang, L., Keefer, C.J., Leach, S.D., Petenpol, J.A. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and taxol induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* 273: 30777-30784. (1998)
- (26) Goren, N., Woerdenbag, H.J., Johansson, C.B. Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subs. *Praeteritum*. *Planta med.* 62: 419-422 (1996)
- (27) <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/sesqlactone/sesqlactone.html>. Elaborada por Stefania Carpino. Department of animal science. Cornell University, Ithaca, N.Y. Elaborada el 15/03/98, modificada el 18/10/00
- (28) Lyss, G., Schmidt, T.J., Merfort, I., Pahl, H.L. Helenalin, an antiinflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. *Biol. Chem.* 378: 951-961 (1997)
- (29) Calera, M.R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Bautista, B.H., Anaya, A.L., Hensen, B.L., Mata, R. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry*. 40: 419-425. (1995)
- (30) Steffen, P., Henher, Michael, Henrich, Peter, M., Markus, V., Frank, R., Volker, L., Klaus, S., Wulf, Droge y Lienharschmitz, M. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (3): 1288-1297 (1988).
- (31) Mitsuo Jisaka, Hajime Onigashi, Kasunori Takegawa, Michael, A., Huffman y Koichi Koshimizu. Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(5): 833-834 (1993)
- (32) Giordano, O.S., Guerrero, E., Pestchanker, M.J. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Natl. Prod.* 53: 803-809 (1990).
- (33) Topeu, T., Cordell, G.A., Farworth, N.R., Fong, H.S. Studies on zoapatle VII: Novel cytotoxic sesquiterpene lactone from *Montana tormentosa* spp. *Microcephala*. *J. Pharm. Sci.* 77: 553-556 (1996)
- (34) Díaz, E., Barrios, H., Nava, J.L., Enriquez, L.G., Guzmán, A., León, G.L., Fuentes, J.F., Fuentes, B.A., Quintero, A., Solano, J.D. Stereoselective Michael

- adition of 6-Amino-1,3-dimetil-2,4-pyriminedione to the exocyclic methylene of tree sesquiterpene lactones *J. Heterocyclic chem.* 34 1037-1041 (1997)
- (35) Park, E.J., Kim, J Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Inula britannica* *Planta Med.* 64: 752-754. (1998)
- (36) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H y Currie, A.R Apoptosis. a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics *Br. J. Cancer* 26 239-257 (1972).
- (37) Cohen, J.J Apoptosis. *Immunol Today* 14 126-130 (1993).
- (38) Williams, G T. Programed cell death apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 65 1097-1098 (1991)
- (39) Arends, M.J., Morris, R G , Wyllie, A.H. Apoptosis. the role of endonuclease *Am. J. Pathol.* 136 539-608 (1990)
- (40) Compton, M.M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast. Rev.* 11 105-119 (1992)
- (41) Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, necrosis An overview of cell death *Am. J. Pathol.* 146. 3-16 (1995)
- (42) Wyllie, A.H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues An overview *Cancer Metast. Rev.* 11 95-103 (1992)
- (43) Wyllie, A.H., Arends, M.F., Morris, R G , Walker, S.W , Evan, G. The apoptosis endonuclease and its regulation *Seminars Immunol.* 4 389-398 (1992)
- (44) Schwerchel, J U The morphology of various types of cell death in prenatal tissues *Teratology.* 7. 253-266. (1973).
- (45) Kinloch, A., Ross, Treheme, J, Mark, Furness, I., Mike, Irad, Hajimohamadreza The Pharmacology of Apoptosis. *Tips.* 20 35-42 (1999)
- (46) Raff, M.C and Farra, T Growth factors and survival. *Nature.* 356 397-400
- (47) Malik, R K Integrines in growth and disease *Pediatric Hematology/Oncology.* 19. 541-545 (1997).
- (48) Frisch, S.M , Smith, C.A , Obeid, L M. Integrin deprivation and apoptosis. *J. Cell Biology* 135 1377-1382 (1996)

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- (49) Meredith, J E y Schwartz, M A The TNF receptor superfamily. *Trends Cell Biology*. 7. 146-150 (1997)
- (50) Nagata, S Apoptosis by death factor *Cell*. 88 355-365 (1997)
- (51) Mc Geehan, G.M Metabotropic receptors modulated apoptosis in neurons. *Nature*. 370: 558-561 (1994)
- (52) Copani, A., Henari, M Adenilate ciclase inhibition by metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 47. 890-897 (1995)
- (53) Peña, L A, Fuks, Z y Kolesnick, R Sphingomielyn hidrolisis and its implications. *Biochem. Pharmacol.* 53: 615-621 (1997).
- (54) Testi, R., Peña, L.A Ceramide and apoptosis *Trends Biochem Sci.* 21. 468-471 (1996)
- (55) Martin, D W., Muñoz, R M., Subler, M A., Deb, S p53 binds to the TATA-binding protein-TATA complex *J. Biol Chem.* 268 13062-13067. (1993)
- (56) Walker, K.K., Levine, A J Identification of anovel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93. 15335-15340 (1996).
- (57) Miyashita, T., Reed, J C Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene *Cell* 80 293-299 (1995)
- (58) Caelles, C., Helmborg, A., Karen, M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes *Nature*. 370 220-223. (1994)
- (59) Vaux, D.L y Korsmeyer, S J Cell death in development *Cell*. 96 245-254 (1999)
- (60) Green, D.R y Reed, J C Mitochondria and apoptosis *Science*. 281 1309-1312 (1998)
- (61) Thornberry, N A. y Lazebnik Caspases enemies within. *Science* 91: 627-637 (1998).
- (62) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E y Croce, C. Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular Lymphoma *Science*. 228. 1440-1443 (1985)
- (63) Reed, J.C Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 387 773-776 (1997)

- (64) Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A.J. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein With restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective antiapoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 12401-12406 (1997)
- (65) O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., Y Huang, D.C Bim a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis *EMBOJ* 17 384-395 (1998)
- (66) Inohara, N., Ekhterae, D., Garcia, I., Carrio, R., Merincy, J., Merry, A., Chen, S Y Núñez, G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL *J. Biol. Chem.* 273: 8705-8710 (1998)
- (67) Hong, Z., Qunli, X., Stanislaw, K.J., Maryla, K., Zhihua, X., Sally, F y Reed, J.C. BAR¹ an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins *PNAS.* No 6 97 2597-2602 (2000)
- (68) Adams, J.M. y S Cory The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival *Science.* 281 1322-1326 (1998)
- (69) Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaefer, E., Martinou, J.C y Tschopp, J. The protein Bcl-2 α does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis *J. Cell Biol.* 126 1059-1068 (1994)
- (70) Hunter, J.J y Parslow, T.G A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis *J. Biol Chem.* 271 8521-8524 (1996)
- (71) Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Madows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D.J., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L. y Fesik, S.W X-ray and NMR structure of human Bcl-XL an inhibitor of programmed cell death *Nature* 381 335-341 (1996).
- (72) Chou, J.C., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J y Wagner, G Solution structure of Bid, an intracellular amplifier of apoptotic signaling *Cell.* 96 615-624 (1999)

- (73) Hokenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death *Nature*. 348 332-336 (1990)
- (74) Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer-mitochondrial membranes *Cancer Res.* 53 4701-4714. (1993)
- (75) Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B., Andrews, D.W. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveals spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types *EMBO J.* 15 4130-4141 (1996)
- (76) Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl-X_L during apoptosis *Proc. Natl Acad. Sci.* 94. 3668-3672 (1997)
- (77) Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis *J. Cell Biol.* 139 1281-1292 (1997)
- (78) Gross, A., Jockel, J., Weil, M.C., Korsmeyer, S.J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17. 3878-3885 (1998).
- (79) Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex *Mol. Cell.* 3 287-296 (1999)
- (80) Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factors results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L. *Cell* 87 619-128 (1996)
- (81) Mc Donnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Cowburn, D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: A structural basis for apoptotic agonists and antagonists *Cell*. 96 625-634 (1999).

- (82) Harada, A., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.J., Scott, S.D., Korsmeyer, S.J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria anchored protein kinase A *Mol. Cell.* 3: 413-422. (1999).
- (83) Haldar, S., Jene, N., Croce, C.M. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4507-4511 (1995)
- (84) Ito, T., Deng, X., Carr, B., May, W.J. Bcl-2 phosphorylation required for antiapoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272: 11671-11673 (1997)
- (85) Poommipanit, P.B., Chen, B., Ohuai, Z.N. Interleukin-3 induces the phosphorylation of a distinct fraction of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 274: 1033-1039 (1999)
- (86) Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94: 491-501 (1998)
- (87) Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell.* 80: 293-299 (1995)
- (88) Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accaritti, M.A., Lindsten, T., Thompson, C.B. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X_L. *Immunity.* 3: 87-98 (1995)
- (89) Kosopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig, R.W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequences similar to BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3516-3520. (1993).
- (90) Grumont, R.J., Rourke, I.J., Gerondakis, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes & Development.* 13: 400-411 (1999).
- (91) Von Freuden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity.* 7: 147-154 (1997)
- (92) Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadool, R., Mazzei, G., Nichols, A., Martinou, J.C. Bax induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell. Biol.* 143: 217-224 (1998).

- (93) Jurgensmeier, J M., Xie, Z , Deveraux, Q , Ellerby, L., Bredesen, D , Reed, J C Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 95 4997-5002. (1998)
- (94) Shigeomi Shimizu, Masashi Narita y Yoshihide Tsujimoto Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC *Nature* 399 483-487 (1999)
- (95) Shimizu, S , Eguchi, Y , Kamiike, W , Funahashi, Y , Mignon, A., Lacronique, V , Matsuda, H., Tsujimoto, Y Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 1455-1459 (1998)
- (96) Kane, D J , Sarafian, T A , Antón, R , Hahn, H , Gralla, E B., Valentine, J S , Ord, T , Bredesen, D E Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species *Science* 262 1274-1277. (1993).
- (97) Hockenbery, D M , Oltvai, Z W , Yin, X M , Milliman, C L., Korsmeyer, S J Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis *Cell*. 75 241-251 (1993)
- (98) Earnshaw, W C , Martins, L M Kaufmann, S H. Mammalian caspases structure, activation, substrates and functions during apoptosis *Annu. Rev. Biochem.* 68 383-424. (1999)
- (99) Budiherdjo, I , Oliver, H , Lutter, M , Lou, X , Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15 269-290 (1999)
- (100) Cikala, M , Wilm, B , Hobmayer, E , Bottger, A , David, C N identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.* 9:959-962. (1999)
- (101) Thornberry, N A. y Lazebnik, Y Caspases enemies within. *Science*. 281 1312-1316 (1998)
- (102) Thornberry, N A Acombinatorial approach defines specificities of member of the caspase family and granzyme B Functional relationships established for key mediators of apoptosis *J. Biol Chem.* 272 17907-17911 (1997).

- (103) Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273: 2926-2930 (1998).
- (104) Salvesen, G.S. y Dixit, V.M. Caspase activation, the induced proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 10964-10967 (1999).
- (105) Rodríguez, J.Y., Lazebnick, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13: 3179-3184 (1999)
- (106) Stennicke, H.R. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274: 8359-8362 (1999)
- (107) Li, P. Cytochrome c and ATP-dependent formation of APAF-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91: 479-489 (1997)
- (108) Bere, H.M. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* 2: 469-475 (2000)
- (109) Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C. y Cohen, G.M. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 KDa) caspase activating complex. *J. Biol. Chem.* 274: 22686-22692 (1999)
- (110) Cain, K. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 1.4 Mda apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* 275: 6067-6070. (2000).
- (111) Hofmann, K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 113-1128 (1999)
- (112) Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. y Fesik, S.W. NMR structure and mutagenesis of the Fas death domain. *Nature.* 384: 638-641. (1996)
- (113) Sakahira, H., Enari, M. y Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor results in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391: 96-99 (1998)
- (114) Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell. Res.* 256: 12-18. (2000)
- (115) Rao, L., Pérez, D. y White, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135: 1441-1455 (1996).

- (116) Kathakota, S., et al Caspase-3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298 (1997)
- (117) Deveraux, Q.L y Reed, J.C IAP family proteins supressors of apoptosis *Genes Dev.* 13 239-252 (1999)
- (118) Jiang, Y, Woronocz, J.D, Liu, W y Goeddel, D.V Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science.* 283 543-546. (1999)
- (119) Savill, J. Apoptosis: phagocytic docking without shocking *Nature.* 392: 442-443. (1998)
- (120) Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L y Henson, P.M The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes *Cell Death Differ.* 5 557-563 (1998)
- (121) Voll, R.E., Hierrmann, M., Roth, E.A., Stach, C y Kalden, J.R. Immunosuppressive effects of apoptotic cells *Nature.* 390 350-351 (1998)
- (122) Wynder, E.L y Gori, G.B Contribution of the enviroment to cancer incidence. An epidemiologic exercise *JNCI.* 58 825-830 (1997)
- (123) Hermann, R.L., Kraupp, D.G., Wilfred, D Dose response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis *Mutation Research.* 464 13-18 (2000)
- (124) Creasey, N.A. The vinca alkaloids and simillar compounds *Cancer chemoter.* 3 79-96 (1981)
- (125) Taxol *The Lancet.* Vol 339 1447-1448 (1992)
- (126) Matthew Suffness Editor Taxol Science and applications. Ed CRC press USA The use of taxol in cell biology Richar B.V 127-132 (1995)
- (127) Quintero, A., Pelcastre, A y Dolores, S.J. Antitumoral activity of new pirimidine derivates of sesquiterpene lactones *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2 (3) 108-112 (1999).
- (128) Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H CD28 costimulation can promote Tcell survival by enhancing the expresion of Bcl-X_i. *Immunity.* 3 87-98 (1995)
- (129) Fisher D.E The p53 tumor suppressor, critical regulator of life and death in cancer *Apoptosis.* 6: 7-15 (2001)

- (130) Gong, J, Frank, T y Darzynkiewyz, Z A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells *Analytical Biochem.* 218 314-319 (1994)
- (131) David, E F Apoptosis in cancer therapy crossing the threshold *Cell.* 78 539-542 (1994)
- (132) Bamford, M, Walkinshaw Therapeutic Applications of apoptosis research *Exp. Cell. Res.* 256 1-11 (2000)