

183



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DEL TIPO DE MUERTE CELULAR (APOPTOSIS,
NECROSIS O AUTOFAGIA) INDUCIDA EN CULTIVOS CORTOS DE
CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO POR DIFERENTES AGENTES
ANTINEOPLASICOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A ,
INTI ALBERTO DE LA ROSA VELAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS BENITEZ BRIBIESCA.



MEXICO, D. F.



2002

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"CARACTERIZACION DEL TIPO DE MUERTE CELULAR (APOPTOSIS, NECROSIS O AUTOFAGIA)
INDUCIDA EN CULTIVOS CORTOS DE CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO POR DIFERENTES
AGENTES ANTINEOPLASICOS"

realizado por INTI ALBERTO DE LA ROSA VELAZQUEZ

con número de cuenta 9311935-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DR. LUIS BENITEZ BRIBIESCA

Propietario DR. FELIX RECILLAS TARGA

Propietario DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

Suplente DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

Suplente M. EN I.B.B. BENITO ESTRADA MENA

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Hoy culmina una etapa mas de mi vida y quiero agradecer profundamente a mi papá Raymundo de La Rosa Caballero y a mi mamá Evila Velázquez Pineda todo el apoyo físico, moral y económico que me han brindado hasta ahorita y que me seguirán brindando mas adelante, pero en especial quiero agradecerles el que sean unos padres excelentes, que han sabido guiarme a través del difícil camino de la vida, que me han brindado amor sin límites y me han enseñado a ser independiente y a valorar todo lo que tengo. Le doy las gracias también a mis hermanos Ricardo y Nataly por todo su apoyo y amor a cada momento. Este pequeño logro es de todos. GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Benítez Bribiesca por todo su apoyo y su tiempo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por haberme dado todas las bases para poder iniciar una carrera en investigación y por haber soportado a inti todo este tiempo y el que falta. Mil gracias doctor.

A la Dra. Guadalupe Quiñónez Silva, por su ayuda incondicional, sus consejos, y por haberme permitido trabajar en su laboratorio todo este tiempo sin restricciones.

Al laboratorio de Apoptosis de la UIMEO (Paty, Rubí, Martina, Nubia, Diana, Janusz) por todo el esfuerzo conjunto para sacar adelante este proyecto.

Al laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica a los Doctores Sebastián Castillo y Emilio castellanos por su invaluable ayuda, A Victor , Eduardo, Juanito y Carmelita por apoyarme en todo momento y en especial a Elizabeth Mravko "La guera" por toda la ayuda para los cortes de las células.

A los servicios de cirugía de mama del hospital de oncología del Centro Médico Nacional S. XXI y del Hospital General De México por las muestras obtenidas para este trabajo.

Mi total agradecimiento a las pacientes que amablemente accedieron a colaborar en este trabajo a pesar de los momentos difíciles por los cuales están pasando.

Mil gracias de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A toda mi familia por haberme apoyado de muchísimas formas y en todo momento, a mis abuelos, tíos, primos y sobrinos.

A Miguel Ángel Sandoval por ser mi compañero de batalla en el laboratorio y estar presente en todos mis logros y fracasos, pero mas que nada por brindarme su amistad y lealtad incondicional..... Tortuguita sabes que es mutuo.

A Rita Mota por haber creado un ambiente familiar en el laboratorio, por toda su ayuda para este proyecto y por soportar mi música día a día. Muchas gracias Rita.

A mi cuate, amigo, hermano Ernesto Soto-Reyes Solís Ya era hora verdad!!!! Gracias por todo tu apoyo en todos los planos y mi tía Narda por haberme aceptado dentro de la familia y apoyarme como a otro hijo. Neto, tu sabes que este proyecto también es tuyo.

A mis super cuates Tezcatlipoca, Roberto, Janusz, Israel, Diana Sughey, Dianita Luque, Horacio.

A Paty Mussali, espero que sigamos siendo amigos por mucho tiempo.

A todos mis compañeros de la carrera por todas las experiencias compartidas.

A todo el personal de la UIMEO.

A todos mis amigos que pudieran hacer falta aquí.

Con mucho amor a Ana Paula..... mil gracias por sacarme siempre adelante.

INDICE

INTRODUCCIÓN

• La muerte celular	1
○ Apoptosis	3
○ Necrosis	6
○ Autofagia	7
• Muerte celular en cáncer	12
• Planteamiento del problema	15
• Hipótesis	16
• Objetivo	16
• Material y Métodos	17
○ Muestras de tejido	17
○ Disgregación del tumor	17
○ Cultivo celular	18
○ Inmunotinción	18
○ Tratamiento con antineoplasicos	19
○ Métodos de detección de muerte celular	20
▪ TUNEL	21
▪ Citoquímica de fosfatasa ácida	22
▪ Microscopía electrónica de transmisión	22
▪ Extracción y electroforesis de ADN	23
▪ Técnica de cometas	23
▪ Caracterización del tipo de muerte celular	24
• Resultados	25
○ Tumor 1	28
○ Tumor 2	29
○ Tumor 3	30
• Discusión	42
○ La apoptosis y la autofagia como tipos mas frecuentes de muerte celular	43

• Conclusiones	46
• Programa de trabajo	47
• Apéndice	48
○ 1.- Técnica de Inmunocitoquímica	48
○ 2.- Técnica de fosfatasa ácida	49
○ 3.- Propiedades del 5- fluoracilo	51
○ 4.- Propiedades de la epirubicina	52
• Bibliografía	53

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.- Fases se la apoptosis	5
Figura 2.- Sistemas de degradación lisosomal	9
Figura 3.- Cultivo de células epiteliales	25
Figura 4.- Inmunodetección de citoqueratinas	26
Figura 5.- Inmunodetección de receptor de estrógeno α	26
Figura 6.- Inmunodetección del receptor de estrógeno β	27
Figura 7.- Inmunodetección del receptor de progestágeno	27
Figura 8.- Gráficas de viabilidad	31
Figura 9.- a)Cultivo de células de mama sin detección de fosfatasa ácida	32
b)Cultivo de células de mama con detección de fosfatasa ácida	32
Figura 10.- a)Frotis de células de mama sin detección de fosfatasa ácida	33
b)Frotis de células de mama con detección de fosfatasa ácida	33
Figura 11.- Gráficas de actividad de fosfatasa ácida	34
Figura 12.- Electroforesis de ADN	35
Figura 13.- Célula positiva al marcaje de TUNEL	36
Figura 14.- Gráficas de TUNEL	37
Figura 15.- Imágenes de la técnica de cometas	38
Figura 16.- Gráficas de porcentajes de cometas	39
Figura 17.- a)Microscopia electrónica de autofagosomas	40
b)Microscopia electrónica de autofagosomas a mayor amplificación	41
Tabla 1.- Genes que participan en el proceso autofágico.	9
Tabla 2.- Resultado de Inmunocitoquímica de células en cultivo	28

De La Rosa-Velázquez I A. 2002. Caracterización del tipo de muerte celular (apoptosis, necrosis o autofagia) inducida en cultivos cortos de células de carcinoma mamario por diferentes agentes antineoplásicos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

RESUMEN

Durante mucho tiempo se considero a la apoptosis y a la necrosis como los únicos tipos de muerte celular presente en los organismos multicelulares como resultado tanto de procesos fisiológicos como patológicos. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito otra forma de muerte celular denominada autofagia o muerte lisosomal, la cual se ha encontrado presente a lo largo de la escala evolutiva y se caracteriza por la presencia de vacuolas autofágicas que degradan todo el contenido celular dando como consecuencia la muerte. La autofagia se ha descrito como resultado de procesos fisiológicos (metamorfosis de insectos) y patológicos (enfermedad de parkinson). En el presente estudio se evaluó la capacidad de los fármacos antineoplásicos 5- fluoracilo (5FU) y Epirubicina (EPI) para inducir apoptosis, necrosis y autofagia en células aisladas de tumores de mama. Para ello se obtuvieron 3 biopsias de tumores de mama, los cuales fueron disgregados para obtener las células, las cuales fueron tratadas con 5FU (6µg/ml), EPI (0.04 µg/ml) y la combinación de ambos durante 2, 4 y 6 horas. Las diferentes técnicas de detección de muerte celular utilizadas, permitieron identificar que en el tumor 1 predominó la muerte autofágica, en el tumor 2 se observó una combinación de apoptosis y autofagia y que en el tumor 3 se detectó solo apoptosis. Lo que permite concluir que la muerte por autofagia puede también puede ser inducida por los agentes antineoplásicos ya que hasta la fecha solo se consideraba que inducían apoptosis y necrosis. La apoptosis y al autofagia son procesos no excluyentes y la activación de la vía autofágica puede representar otro blanco potencial para el diseño de nuevos fármacos antineoplásicos.

CARACTERIZACIÓN DEL TIPO DE MUERTE CELULAR (APOPTOSIS, NECROSIS O AUTOFAGIA) INDUCIDA EN CULTIVOS CORTOS DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO POR DIFERENTES AGENTES ANTINEOPLÁSICOS.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular desempeña un papel fundamental en multitud de fenómenos biológicos y en procesos patológicos variados. Junto con la proliferación y diferenciación, la muerte celular es indispensable en la homeostasis tisular, en la embriogénesis, en la metamorfosis y en la modulación del aparato inmune. En los procesos patológicos es la resultante final del daño celular irreversible inducido por numerosos agentes endógenos y exógenos y representa una forma de escape al daño genético irreparable.

Dentro de la literatura científica del siglo XIX se encuentran reportes de anatomistas que comentan la muerte celular usualmente relacionada a la metamorfosis de los renacuajos e insectos. Lo que actualmente conocemos como apoptosis fue descrito por primera vez por Walter Flemming en 1885 como alteraciones nucleares que recibieron diferentes denominaciones como por ejemplo, picnosis. Otras variantes morfológicas de muerte celular también fueron descritos entre las que destaca la degeneración vacuolar. En la década de 1960 aparecieron numerosas publicaciones sobre la muerte celular en embriones la cual se sospechaba que pudiera ser un proceso genéticamente programado (Lockshin, 2001).

Pero a pesar de todos estos reportes, hasta antes de 1970 solo se aceptaba la existencia de una forma de muerte celular que se denominaba necrosis y que se consideraba la consecuencia del daño celular inducido por hipoxia, agentes físicos como la radiación, agentes químicos diversos, infecciones, o reacciones inmunológicas anormales.

Kerr y Willie demostraron que existe otra forma de muerte celular (Kerr, 1972), que aunque puede resultar de la acción de los mismos agentes lesivos, sigue un curso característico con una serie de etapas claramente determinadas por la expresión de una compleja red de genes. Este tipo de muerte se le ha llamado comúnmente muerte celular programada o apoptosis y es la responsable de llevar a cabo los procesos de embriogénesis, metamorfosis y homeostasis tisular, donde la muerte de las células en forma regulada es indispensable. Por ello en la actualidad se consideran dos tipos de muerte celular claramente diferenciadas: la necrosis y la apoptosis o muerte celular programada. Sin embargo, en los últimos 8 años, diversos grupos de investigación han descrito lo que parece ser otra forma de muerte celular programada que se denominó inicialmente apoptosis tipo II para distinguirla de la descrita por Kerr y Willie y que en la actualidad se le conoce como muerte lisosomal o autofagia.

Con los métodos actuales de biología molecular, inmunohistoquímica y microscopía electrónica es posible diferenciar los tres tipos de muerte celular y con ello estudiar el papel que desempeñan en los procesos biológicos normales y patológicos.

APOPTOSIS

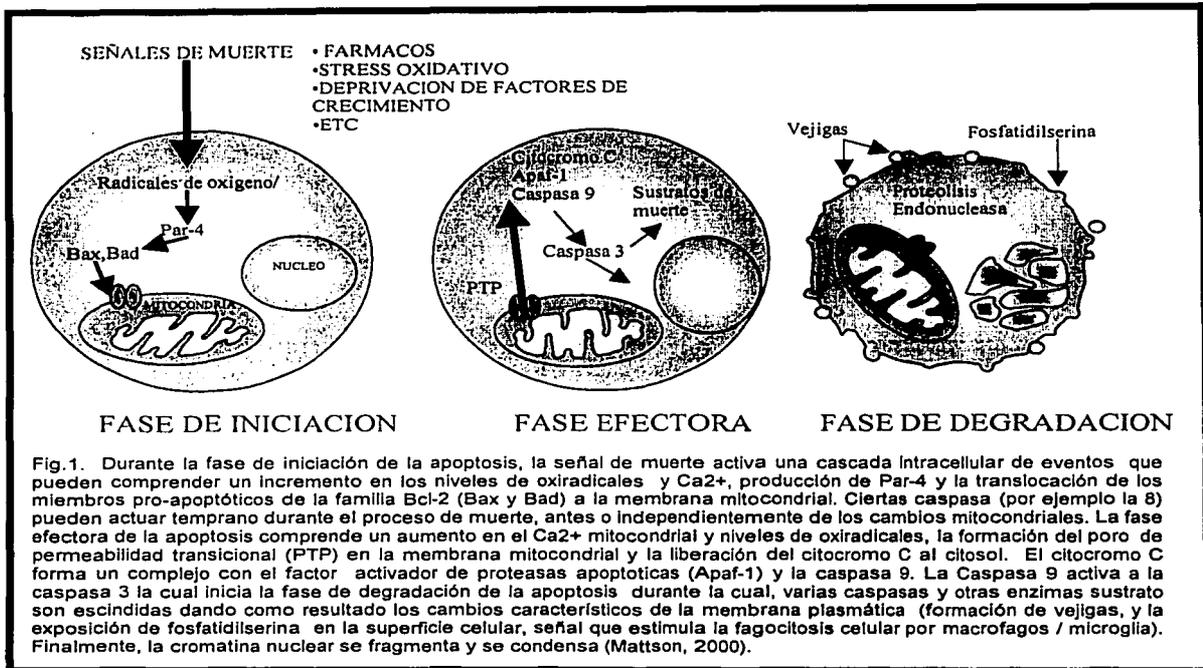
La apoptosis, o muerte celular programada en los organismos multicelulares, regula la pérdida celular con la misma eficiencia que se regula el crecimiento y la diferenciación celular y constituye un fenómeno vital (Lavin, 1993).

Este fenómeno es responsable de numerosos procesos fisiológicos y patológicos tales como la destrucción programada de células durante la embriogénesis y la metamorfosis, la involución en los tejidos hormono-dependientes en el adulto; la eliminación de células en poblaciones celulares proliferativas, la muerte de células del sistema inmune; la atrofia patológica de tejidos hormono-dependientes, la atrofia patológica de órganos parenquimatosos posterior a una obstrucción ductal, la muerte celular inducida por células T citotóxicas, el daño celular en ciertas enfermedades virales y la muerte celular producida por una gran variedad de estímulos exógenos (Eastman, 1999).

Los cambios morfológicos que caracterizan a las células en apoptosis se pueden ver claramente en microscopía de luz (Willie, 1980). La imagen característica es la contracción de la célula y la condensación de la cromatina nuclear en masas muy densas dentro y adyacentes a la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. El proceso se divide en tres fases. **La fase de iniciación** en la cual, la señal de muerte activa una cascada intracelular de procesos que comprenden el incremento en los niveles de radicales de oxígeno y Ca^{2+} , la producción de Par-4 y la translocación de los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bak, Bok, Bid, Bad y Bim) a la membrana mitocondrial. Durante la segunda fase, **la efectora**, hay un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} mitocondrial y los niveles de radicales de oxígeno, la

formación de los poros de permeabilidad transicional en la membrana mitocondrial y la liberación del Citocromo C al citosol. La liberación del Citocromo C está controlada por proteínas de la familia Bcl-2: Las inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-X_L) previenen la liberación, mientras que la promotoras de la apoptosis (ya mencionadas) inducen la liberación. La liberación del Citocromo C es un evento rápido (menos de 5 minutos) completo y cinéticamente invariable. Se sabe que siempre es anterior a la exposición de la fosfatidilserina y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Goldstein, 2000). El Citocromo C se une con el factor activador de proteasas 1 (Apaf-1), la procaspasa 9 y el ATP o dATP formando un complejo llamado apoptosoma. Dentro del apoptosoma se activa la caspasa 9, la que a su vez activa a la caspasa 3 con lo que se inicia la última fase de la apoptosis, la **fase de degradación**. La activación de las procaspasas puede ser prevenida por la unión a estas de las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las cuales a su vez son inhibidas por la proteína Diablo/Smac que permiten la continuidad del proceso (De Laurenzi, 2000). Las caspasas son activadas, dando como resultado cambios característicos en la membrana plasmática que forman vejigas y se expone la fosfatidilserina en la superficie celular, la cual es una señal que estimula la fagocitosis por los macrófagos (Mattson, 2000; Zamzami, 2000; Martinou, 2000). En la fase de degradación, la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta. Esta fragmentación se lleva a cabo en dos pasos, el primero es la escisión en fragmentos de alrededor de 50 kilo pares de bases (kpb) y después se generan fragmentos de 180 pares de bases (pb) (Sen, 1992). Esta fragmentación del ADN se debe a la activación de endonucleasas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺ principalmente la DNA_{asa} activada por caspasas (CAD) presente en la célula

apoptótica (Meyn, 1994; Liu 1997; Enari, 1998) y por las catepsinas y la DNAasa II de la célula fagocítica (Wu, 2000; Mullroy, 2000; Ferri, 2000). (Fig. 1) En última instancia, las vejigas de la membrana plasmática se separan y forman los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas o los macrófagos por lo que no queda ninguna evidencia del proceso ni desencadenan fenómeno inflamatorio alguno a diferencia de la necrosis.



Como se puede ver la apoptosis es un fenómeno complejo que requiere de la activación secuencial de genes celulares específicos por lo que se considera un fenómeno genéticamente programado.

NECROSIS

La necrosis es el tipo más común de muerte celular resultante de un daño exógeno que generalmente afecta a grupos de células contiguas, tejidos y a veces órganos. Morfológicamente, el primer cambio es el hinchamiento del citoplasma de las células afectadas y la alteración irreversible de los organelos celulares. Dos procesos esencialmente concurrentes traen en consecuencia los cambios de la necrosis: La digestión enzimática de la célula (autólisis) y la desnaturalización de las proteínas debida por lo general a la liberación de enzimas lisosomales (Yasuda, 2000).

Las características morfológicas principales de una célula necrótica son el aumento de la eosinofilia y la apariencia vidriosa homogénea del citoplasma. Los cambios nucleares aparecen en la forma de uno de tres patrones: a) la disminución de la basofilia de la cromatina o cariólisis. b) la picnosis, caracterizada por condensación nuclear e incremento de la basofilia, y c) la cariorrexis o fragmentación del núcleo. En las etapas finales, las células estallan liberando todo su contenido en el tejido circundante desencadenando el proceso de inflamación (Cotran, 1994).

Es importante destacar que esta forma de muerte celular es consecuencia de agentes exógenos lesivos y que por ello siempre es responsable de un proceso patológico (Majno, 1995 y 1996). Debido a la característica de hinchamiento que sufre la célula necrótica, se ha propuesto llamar a este tipo de muerte celular "Oncosis" y reservar el término necrosis únicamente al proceso de destrucción del cuerpo celular, fenómeno que se comparte con la etapa final de la apoptosis (Majno, 1995).

AUTOFAGIA

Durante la pasada década la apoptosis atrajo un interés creciente de la comunidad científica y se obtuvo un gran conocimiento en lo concerniente a los eventos moleculares de su señalización, preparación y ejecución (Reed,2000). Sin embargo, se ha acumulado suficiente evidencia tanto morfológica como bioquímica que sugiere que la muerte celular programada no está confinada solamente a la apoptosis, sino que las células usan diferentes vías para llevar a cabo una auto-destrucción activa (Schwartz, 1993 - Bursch, 2000).

La posibilidad de que existiera otro tipo de muerte celular programada diferente a la apoptosis fue reconocida por vez primera en 1993, al descubrir que durante la metamorfosis de la larva *Manduca sexta* las células del músculo intersegmental (MIS) son eliminadas mediante un proceso de muerte que no tiene las características típicas de la apoptosis, ya que, aunque hay contracción celular, no se producen cuerpos apoptóticos ni hay degradación de la cromatina. Lo más característico es el aumento en el número de lisosomas y la degradación de proteínas. Esta observación llevó a los autores a plantear que la muerte de las células del MIS podría representar un mecanismo diferente a la apoptosis dando sustento a la hipótesis de que existe más de un patrón de muerte celular programada (Lawrence M, 1993). Este otro mecanismo fue denominado apoptosis tipo II o degradación lisosomal, aunque recientemente se ha aceptado el término de autofagia.

Sin embargo, este término puede dar lugar a confusiones, pues también este término se utilizó para denominar al proceso normal mediante el cual las células degradan su propio citoplasma (Seglen, 1990). Este proceso es dinámico y

consiste en el rearrreglo de las membranas subcelulares para secuestrar parte del citoplasma y en ocasiones organelos completos para transportarlos a los lisosomas donde son degradados y reciclados y se sabe que la degradación de las estructuras fagocitadas esta mediada por catepsinas lisosomales, principalmente la B y la D. (Uchiyama, 2001) (Fig. 2). La autofagia se ha estudiado principalmente en levaduras y se ha visto que es un proceso altamente regulado a través de la acción de varias cinasas, fosfatasas y guanosín trifosfatasas (GTPasas) (George, 2000) y que requiere de la activación de muchos genes, principalmente los de la familia Apg (Tabla 1) (Klionsky, 2000). La degradación de proteínas celulares a través de una vía autofagosómico - lisosomal es importante en el control del crecimiento normal y se sabe que este proceso puede estar alterado en las células neoplásicas. A nivel molecular el gen *beclin 1* es uno de los muchos que regulan la autofagia. Es estructuralmente similar al gen *apg/vps30* responsable de los procesos autofágicos en levaduras. Se ha reportado que la actividad promotora de autofagia de *beclin 1* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, está asociada con la inhibición de la proliferación celular y con la tumorigenesis en ratones desnudos. Además se ha visto que cuando existe una delección monoalélica como se ha reportado en el 40 - 70% de los casos de cáncer de mama, se produce una acumulación de proteínas que la célula no utiliza y lo que puede inducir la replicación celular incontrolada y con ello alteraciones en la homeostasis tisular (Liang, 1999; Aita, 1999).

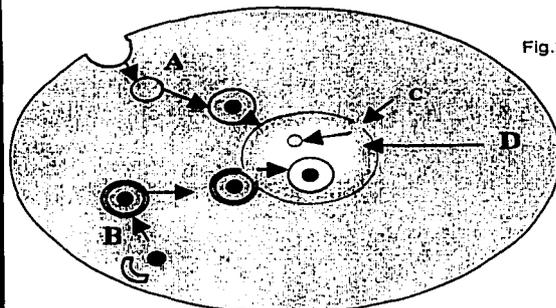


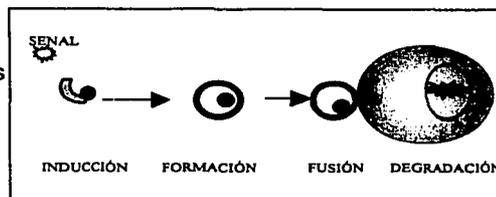
Fig.2 SISTEMAS DE DEGRADACIÓN LISOSOMAL.

- A. Endocitosis: un conjunto específico de proteínas de membrana son internalizadas y transportadas al lisosoma.
- B. Macroautofagia: Una porción del citoplasma, incluyendo un organelo es rodeado por una doble membrana, el autofagosoma, el cual se fusiona posteriormente con un lisosoma donde el contenido es degradado.
- C. Microautofagia: Secuestro de citosol o de organelos mediado por la invaginación de la membrana lisosomal.
- D. Transporte directo: Varias proteínas que contienen la secuencia consenso KFERQ son transportada directamente a través de la membrana lisosomal por medio de proteínas de choque térmico. (Ohsumi, 2001)

TABLA1: GENES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO AUTOFÁGICO NORMAL Y QUE PUDIERAN ESTAR IMPLICADOS EN EL DE MUERTE CELULAR

INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA Y FORMACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA		SISTEMAS DE CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS APG		REGULACIÓN DEL TAMAÑO DEL AUTOFAGOSOMA	
LEVADURA	MAMÍFEROS	LEVADURA	MAMÍFEROS	LEVADURA	MAMÍFEROS
Tor2	mTor	APG5	HAPG5	AUT2	
APG1	ULK1	APG7	HsGSA7	AUT7	GATE - 16
APG6	BECN1	APG10			MAP LC3
APG9		APG12	HAPG12		
APG13		APG16			
APG14					
APG17					
CVT9					
VAC8					
FUSIÓN AL LISOSOMA		ROMPIMIENTO			
LEVADURA	MAMÍFEROS	LEVADURA	MAMÍFEROS		
VAM3	Syntaxin 7	CVT17			
VAM7		PRB1			
VPS GENES		VMA GENES	V-ATPasa		
YPT7	Rab 7				

(Kilonsky,2000)



Pero la autofagia como proceso de muerte celular aun no esta muy bien caracterizada. En células en cultivo se ha observado un fenómeno de vacuolización citoplásmica que inicia en la región perinuclear y progresa hacia la periferia gracias a su asociación con la red de microfilamentos. Se ha visto que puede llevar a la muerte celular pero no se sabe cual sea el factor que lo desencadena (Henics, 1997 y 1999). En experimentos *in vitro* se ha inducido este tipo de muerte en neuronas cultivadas en ausencia del factor de crecimiento neuronal (Luzheng, 1999) o por efecto de la sobre expresión del oncogén Ras transfectado en células de tumores de glia que normalmente no lo expresan (Shunji, 1999). Se ha demostrado que a diferencia de la apoptosis esta muerte no se bloquea por la sobre-expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 ni por la acción de inhibidores de caspasas, pero sí por la acción de la 3 metiladenina, la cual impide la formación del autofagosoma por lo que se le usa como inhibidor de la autofagia. Además se ha descubierto que las células de la línea MCF-7 de cáncer de mama al ser tratadas con Tamoxifen, 4-hidroxy tamoxifen o ICI 164 384 o las líneas celulares LoVo (adenocarcinoma de colon), LNCaP (carcinoma de próstata) y MCF-7 al ser tratadas con radiaciones, mueren por autofagia (Bursch, 1996; Paglin, 2000), observándose la formación temprana de vacuolas autofágicas. Debido a que la formación de estas estructuras es dependiente del citoesqueleto, las citoqueratinas en estas células se encuentran redistribuidas pero no degradadas como en el caso de la apoptosis y la actina continúa polimerizada en forma de F-actina, proceso ATP-dependiente, lo que caracteriza a este tipo de muerte celular. Es probable que los mismos genes y proteínas que intervienen en

el proceso autofágico normal se activen durante este tipo de muerte celular (Bursch, 2000 y 2001).

El núcleo de las células autofágicas puede presentar apariencia ligeramente picnótica, pero por lo general permanece sin cambios evidentes además de que en las etapas tardías no se encuentra degradado el ADN.

La muerte autofágica o lisosomal se encuentra a lo largo de toda la escala biológica, lo que muestra que se trata de un proceso evolutivamente conservado, filogenéticamente viejo y que probablemente se haya desarrollado antes que la apoptosis. (Schwartz, 1993) Por ello se encuentra tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Dentro de las primeras tenemos la formación del sorocarpo del hongo *Fungi imperfecti*, en el proceso de metamorfosis de las larvas, en el desarrollo de los insectos (Lee, 2001) y durante la embriogénesis de las especies superiores. Se observa en la involución de la glándula mamaria después de la lactancia, en la involución de la próstata post castración (Zakeri, 1995) y en el endometrio durante el ciclo menstrual. Los procesos patológicos que muestran este tipo de muerte celular son la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Cataldo, 1994 ; Anglade, 1997) y en líneas celulares derivadas de tumores de mama sujetos a terapia anti-hormonal *in vitro* (Bursch W, 2000).

Hay situaciones en las cuales la autofagia y la apoptosis pueden ocurrir en los mismos tejidos y ser desencadenadas por señales similares. Se sabe que la autofagia es generalmente independiente de la acción de las caspasas y que la morfología corresponde mas al tipo necrótico (Kitanaka, 1999). Sin embargo, algunos investigadores han encontrado la participación de un zimógeno de la

caspara 9 en este proceso por lo que han acuñado el término de Paraptosis (Sperandio, 2000).

Muerte celular en cáncer

El desarrollo de una masa neoplásica fue considerado por mucho tiempo como el resultado de la desregulación de los genes que controlan la proliferación y la diferenciación celular. En la actualidad se sabe que también la desregulación de los genes que regulan los procesos de muerte celular, constituyen parte del proceso que explica el crecimiento incontrolado de las neoplasias malignas (Evan, 2001).

La pérdida de la homeostasis celular en el proceso de carcinogénesis se debe tanto a la estimulación descontrolada de la proliferación celular como a la disminución proporcional de la muerte celular (Benítez-Bribiesca, 1998).

Los genes que regulan el proceso apoptótico (genes pro-apoptóticos y genes anti-apoptóticos) pueden sufrir mutaciones, deleciones, translocaciones o expresión anormal, lo que da como resultado una célula con desregulación del proceso de apoptosis.

Dentro de los genes mas estudiados relacionados con la apoptosis está el gen *bcl-2*. Este gen fue identificado inicialmente en el cromosoma 18q21 en el punto de rompimiento de la translocación cromosómica t(14:18) que se encuentra en la mayoría de los linfomas foliculares de células B. Este rearrreglo genómico juxtapone al gen *bcl-2* con la secuencia aumentadora (enhancer) del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas dando como resultado una expresión incontrolada de *bcl-2*. Años mas tarde se descubrió que el producto proteico del

gen *bcl-2* es un potente inhibidor de la apoptosis y que esta sobre-expresión se relaciona con el desarrollo de esas neoplasias. Con el paso del tiempo, se descubrió que existe una familia de genes relacionados con *bcl-2* (familia Bcl-2) en los cuales se encuentran genes tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos y las formas alteradas de estos genes se han encontrado en muchas neoplasias (Lowe, 2000).

De manera contraria a *bcl-2*, el gen p53 es el gen pro-apoptótico mas estudiado. Ha sido descrito como el mas frecuentemente mutado en muchos tipos de tumores. Su función principal es cuidar de la integridad del genoma. Tiene actividad de regulación transcripcional y puede detener a la célula en la fase G1 cuando se detecta alguna alteración para ser reparada pero si el daño no es reparable activa la apoptosis. La pérdida de la actividad de p53 es crucial para el desarrollo de la mayoría de los canceres. Esto se ha demostrado en experimentos con ratones p53 (-/-) donde alto grado de desarrollo tumoral en estos organismos confirma la importancia de p53 como gen supresor de tumores (Lohrum, 2000) y a su vez su papel en la regulación de la apoptosis.

Pero a diferencia de la apoptosis, el papel de la autofagia en el cáncer aun no se ha descrito, pero si se ha descrito su presencia como resultado del tratamiento con oncofármacos (Bursch W, 2000). Es posible que la alteración de los genes involucrados en este proceso, como los de la apoptosis, también podrían contribuir a la progresión de un proceso neoplásico.

Es sabido que los diversos tratamientos antineoplásicos son inductores de muerte celular, pero también que las neoplasias tienen diferentes grados de resistencia a esa inducción.

Se ha hecho evidente durante los últimos años que el tipo y grado de muerte celular varía de acuerdo a las diferentes terapias utilizadas en el cáncer encaminadas a la destrucción de las células neoplásicas. Esto se debe a que en los diferentes tumores existe mucha heterogeneidad celular debido a la generación intrínseca de diversas clonas celulares con genotipos y fenotipos diferentes (Benítez-Bribiesca, 1998). Así, el éxito de las terapias antineoplásicas dependerá de la sensibilidad de las células para activar los diferentes programas de muerte celular. Por ello, el estudio de los mecanismos alternos de muerte celular en el cáncer y su respuesta ante los esquemas de tratamiento oncológico reviste una gran importancia.

Planteamiento del problema:

La inducción de muerte en células malignas como resultado del tratamiento con agentes antineoplásicos es un proceso bien documentado en la literatura. Se sabe que la mayoría de estos agentes inducen apoptosis o necrosis según la dosis que se empleen. Recientemente se ha encontrado que la autofagia juega un papel muy importante en el proceso de muerte celular inducido por los mismos agentes. Debido a que los tres tipos de muerte celular tienen una morfología y control genético molecular distinto, resulta necesario determinar a que tipo de muerte celular son susceptibles o resistentes las células malignas de diversos cánceres. En el cáncer de mama, uno de los más frecuentes en el mundo, no se sabe si los oncofármacos inducen necrosis, apoptosis o autofagia.

Hipótesis

Los oncofármacos pueden inducir diversos tipos de muerte celular (apoptosis, necrosis o autofagia) en cultivos primarios de células malignas dependiendo de su mecanismo de acción, dosis y quimiosensibilidad del tumor.

Objetivo

Identificar el tipo de muerte celular (apoptosis, autofagia o necrosis) inducida en cultivos primarios de células neoplásicas de cáncer de mama con diferentes agentes antineoplásicos.

MATERIAL Y METODO

Muestras de tejido

Se obtuvieron 3 biopsias de carcinoma mamario ductal infiltrante etapa clínica II de pacientes sin tratamiento previo, directamente del quirófano en un tubo de 50 ml estéril (Falcon, USA) conteniendo 20 ml de medio de cultivo RPMI - 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), Antibiótico-antimicótico (Penicilina 10. 000 U/ml, sulfato de estreptomina 10, 000 µg/ml y Amfotericina B 25 µg/ml) , Glutación (10 µg/ml), Insulina (5 µg/ml) (GibcoBRL, USA) y L-Glutamina (29.2 mg/ml) (Sigma Co).

Disgregación del tumor

El tejido fue lavado utilizando el medio de cultivo en el que fue transportado, se fragmentó mecánicamente en una caja de petri hasta tener trozos de 1 mm² aproximadamente y se resuspendieron en medio suplementado, con 10% de colagenasa II y III al 0.8% en proporción 1:1, incubándose a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas o hasta que estuvieron completamente disgregados. Dado que la colagenasa no es citotóxica a esta dilución, las células resisten con eficiencia la exposición prolongada a esta enzima sin presentar un daño aparente (Freshney, 1972). El tejido disgregado se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos para obtener

las células, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio suplementado a 10,000 células por mililitro (Shanaz, 1997 ; Speirs, 1998).

Cultivo celular

Las células disgregadas de los tumores se sembraron en cajas de poliestireno T-25 (10^6 células por caja) (Falcon, USA) con medio suplementado hasta que alcanzaron la confluencia, siendo 10 días en promedio.

Inmunotinción

Para confirmar la identidad fenotípica de las células aisladas se sembró una muestra de las células en cámaras de cultivo cuya base es un portaobjetos ("slide flask", Falcon, USA) y se incubaron hasta la confluencia. Las laminillas se fijaron con etanol absoluto durante 5 minutos y se secaron al aire. Se llevó a cabo la inmunodetección con los siguientes anticuerpos primarios:

- ❖ Receptor de progesterona (RP): Anticuerpos monoclonales de ratón, clona (IA-G), dilución 1:50 (Dako Corporation).
- ❖ Receptor de estrógenos alfa (RE- α): Anticuerpos monoclonales de ratón, clona (F-10), dilución 1:50 (Santa Cruz Biotechnology).
- ❖ Receptor de estrógeno Beta (RE- β): Anticuerpos policlonales de conejo , clona (H-150), dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology).
- ❖ Citokeratinas (CK): Anticuerpo monoclonal de ratón (AE1/AE3), dilución 1:50 (Dako corporation).

Las laminillas se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche y se revelaron con el sistema Dako LSAB+ (Dako Corporation). La técnica de inmunocitoquímica está descrita ampliamente en el apéndice #1 de acuerdo a las instrucciones dadas por el proveedor con cambios mínimos.

Tratamiento con antineoplásicos

Una vez alcanzada la confluencia, las células se despegaron de su sustrato, lavándolas con una solución de Verseno (Gibco-BRL, USA) e incubándose posteriormente por 15 minutos con la solución de tripsina (0.05 %) -EDTA (0.53 M) (Gibco-BRL, USA). La actividad de la enzima fue inhibida añadiendo suero fetal bovino y se centrifugó 1200 r.p.m. por 5 minutos para retirar la enzima y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo.

Las células aisladas se utilizaron para ver si los fármacos antineoplásicos 5-Fluoracilo y Epirubicina (Apéndice 3 y 4 respectivamente), utilizados rutinariamente en los esquemas de quimioterapia contra el cáncer de mama, eran capaces de inducir necrosis o algún tipo de muerte celular programada (Apoptosis o Autofagia).

Para ello, un total de 500 000 células se incubaron con 5- Fluoracilo (6 µg/ml) Epirubicina (0.04 µg/ml), concentraciones equivalentes a 1/10 del pico de concentración que se encuentra en el plasma de humanos tratados con estas drogas, (Von Hoff, 1990) y la combinación de ambos durante 6 horas, además del control sin fármaco tanto en suspensión como en cámaras de cultivo de 4 pozos. A los tiempos determinados (2,4 y 6 hrs.) se les retiró el fármaco, se determinó la

viabilidad de las células por la técnica de exclusión de azul de tripano , se aisló el ADN de una porción de ellas y las células sembradas y tratadas en las cámaras de cultivo se fijaron con etanol absoluto y se secaron al aire para las detecciones de TUNEL y fosfatasa ácida (ver a continuación)

De acuerdo a estudios anteriores, estas concentraciones de los fármacos son suficientes para ver sus efectos con una hora de incubación (Von Hoff *et al.*, 1990).

Métodos de detección de muerte celular

Para determinar el tipo de muerte celular que experimentan las células tratadas con los fármacos, se utilizaron diferentes metodologías dependiendo de las características ya descritas para cada tipo de muerte.

Primero se determinó la viabilidad de las células posterior a cada tiempo de incubación con la técnica de exclusión de azul de tripano y posteriormente se aisló y se evaluó el grado de degradación del ADN por electroforesis en agarosa donde la presencia de ADN degradado indica necrosis, la presencia de ADN en patrón de escalera, apoptosis o el ADN de alto peso molecular (no degradado) muerte autofágica.

La técnica de TUNEL consiste en el marcaje de los extremos 3' libres presentes en el ADN degradado y aunque inicialmente fue descrita como una técnica que identificaba células en apoptosis, se ha visto que es capaz de marcar células en necrosis, aunque aun hay mucha controversia a este respecto, por lo que en este trabajo solo lo utilizamos para evidenciar el grado de degradación del ADN.

Una técnica mas sensible para evaluar la degradación del ADN es la electroforesis de ADN en células aisladas (técnica de cometas), capaz de detectar rupturas de cadena sencilla y doble en células individuales (Rojas, 1999; Benitez – Bribiesca, 2001).

La característica principal de la muerte autofágica es el incremento de lisosomas y autofagosomas en el citoplasma de las células que sufren este tipo de muerte (Bursch, 2001). En la actualidad, existen diversos métodos para detectar o marcar estos cuerpos intracitoplasmicos como la monodansyl – cadaverina (Biederbick *et al.*, 1995) o las histoquímicas para detectar la actividad de diversas enzimas lisosomales (catepsina B, Fosfatasa ácida, etc) (Jones, 1993) que puedan indicar un aumento en el número de lisosomas (Waguri, 1999).

En este caso se utilizó una metodología para detectar la actividad de la enzima lisosomal Fosfatasa ácida como indicadora del aumento en el número de lisosomas y se procesaron células para microscopía electrónica con el objetivo de evidenciar la presencia de autofagosomas, los cuales definen a la muerte autofágica.

TUNEL.

Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena utilizando Peróxido diluido al 3% en metanol incubándose 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo el desenmascaramiento de antígenos colocando 1ml de buffer de citratos 10 mM, pH. 6.1 en cada pozo de las laminillas y radiando en el microondas por 10 segundos a 800 W. Posteriormente se incubaron con la enzima terminal transferasa (TdT) durante 1 hr seguida de la incubación con anticuerpo anti-

dUTP por 1 hr. La reacción se reveló con el sistema Dako LSAB+ (Dako Corporation). Como control negativo se incubaron células en ausencia de TdT.

Citoquímica de fosfatasa ácida.

Las células fijadas se incubaron durante 45 min en la solución para detectar la actividad de la enzima de acuerdo al método de Barka y Anderson. Como sustrato se usó naftol AS MX fosfato (sal de sodio) (Williams, 1994). La técnica está descrita en el apéndice, #2

Microscopía electrónica de transmisión.

Las células fueron cultivadas en cápsulas Beem colocadas en forma invertida. A los 3 días de cultivo, la monocapa de células se trató con 5- fluoracilo (6 $\mu\text{g/ml}$) y Epirubicina (0.04 $\mu\text{g/ml}$) por 6 horas y posteriormente se obtuvo la tapa de la cápsula. Las células adheridas a la tapa se lavaron con amortiguador de cacodilato al 0.1 M pH 7.4; se fijaron durante 2 horas en solución de glutaraldehído al 2.5% con paraformaldehído al 1% y ácido tánico al 0.1% en amortiguador de cacodilato al 0.1M, pH 7.4. Posteriormente las células fueron postfijadas en tetraóxido de Osmio al 2%, deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcoholes y se incluyeron en resina araldita (Ciba-Geygi); se realizaron cortes semifinos de una micra de espesor en un ultramicrotomo Porter Blum MT-1, los que fueron teñidos con azul de tolouidina. Se obtuvieron secciones de 60 nanómetros de espesor que se contrastaron con acetato de uranilo (Merck) y

citrato de plomo (Merck)(técnica de Reynolds). Los cortes finos fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM- 906.

Extracción y electroforesis del ADN

Se extrajo el ADN de las células tratadas utilizando el sistema DNAeasy kit (Quiagen, USA) las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 80 Volts . Se tiñó con anaranjado de acridina y se fotografiaron con una cámara Polaroid.

Técnica de cometas

Aproximadamente 10^4 células fueron lavadas con PBS y se procesaron con la técnica de cometas modificada (Rojas *et. al.* 1999). En resumen, el paquete celular se resuspendió en agarosa normal al 1% y se expandieron sobre una laminilla de microscopio formando una capa delgada. Las células se lisaron con una solución hipertónica con 0.1% de tritón durante 1 hora a 4 °C para romper la membrana celular, y se corrió una electroforesis a 35 Volts por 30 minutos a dos diferentes amortiguadores. El primero a pH 8.3 con el cual se identifican rupturas de doble filamento (DNA_{dc}) y el segundo a pH 10 que identifica rupturas de un filamento (DNA_{cs}). Las laminillas se tiñeron con el colorante anaranjado de acridina (10 µg/ml) y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia.

Caracterización del tipo de muerte celular

El tipo de muerte celular se valoró de acuerdo a los siguiente patrones:

APOPTOSIS	AUTOFAGIA	NECROSIS
❖ Fosfatasa ácida (-)	❖ Fosfatasa ácida (+)	❖ Fosfatasa ácida (-)
❖ Tunel (+)	❖ Tunel (-)	❖ Tunel (+)
❖ DNA (escalera)	❖ DNA (sin degradar)	❖ DNA (degradado)
❖ COMETAS (+)	❖ COMETAS (-)	❖ COMETAS (+)

RESULTADOS

En el presente estudio se aislaron células a partir de la disgregación de tres tumores primarios clasificados histológicamente como carcinoma mamario ductal infiltrante etapa clínica II, de los cuales se obtuvieron poblaciones epiteliales que variaron entre el 70 y 80% (Fig. 3), caracterizadas por la detección Inmunocitoquímica de Citokeratinas (Fig. 4), proteínas específicas de las células de estirpe epitelial, además de la detección de los receptores de estrógeno (RE) α (Fig. 5) y β (Fig. 6) y de Progesterona (RP) (Fig. 7). Los tres tumores fueron positivos al RE- β y al RP, mientras que la expresión del RE- α fue muy baja. (Tabla 2)

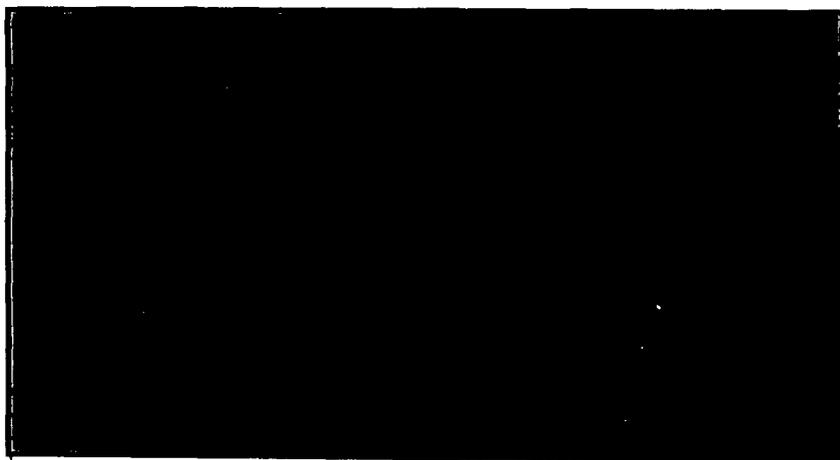


FIGURA 3: Células epiteliales obtenidas de un tumor de mama a 5 días de cultivo. 200X

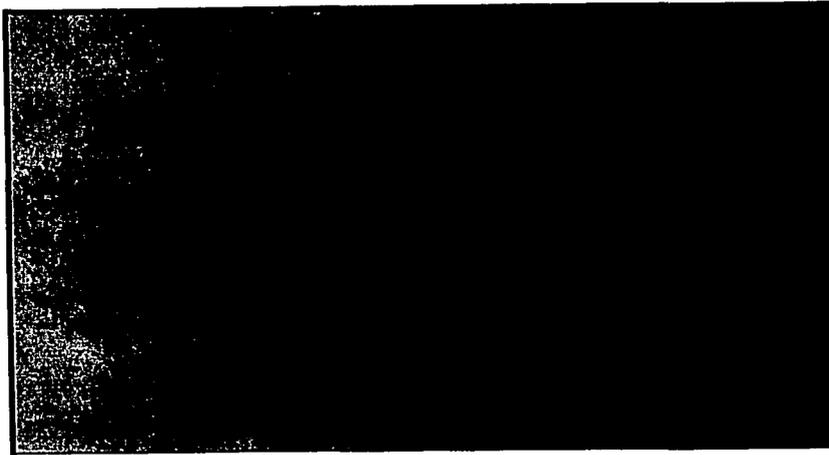


FIGURA 4: Inmuno detección de Citokeratinas en células obtenidas del tumor con 5 días de cultivo. La señal se encuentra bien definida en el citoplasma, lo cual indica la estirpe epitelial de las células. 1000X



FIGURA 5: Inmunodetección del Receptor de Estrógeno α (RE- α) en células de tumor de mama con 5 días de cultivo. La señal se localiza en núcleo de manera específica y como ligeros puntos. 1000X

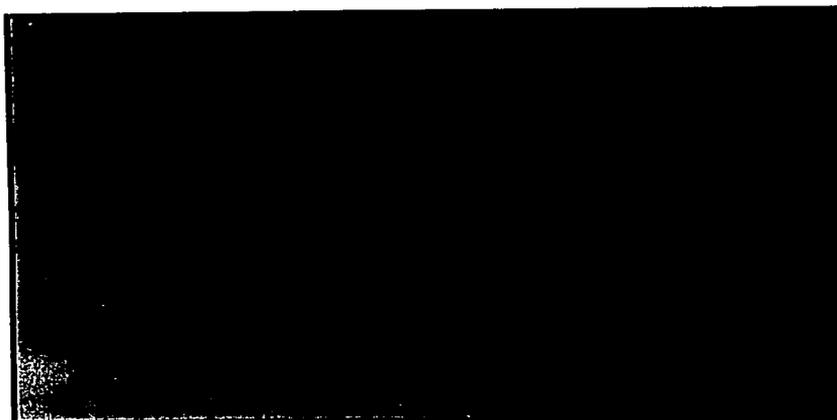


FIGURA 6: Inmunodetección del Receptor de Estrógeno β (RE- β) en células de tumor de mama con 5 días de cultivo. La señal se localiza en núcleo, aunque también se encontró en citoplasma. La intensidad de marcaje varía de un núcleo a otro y no hay detección en el nucleolo. 400X

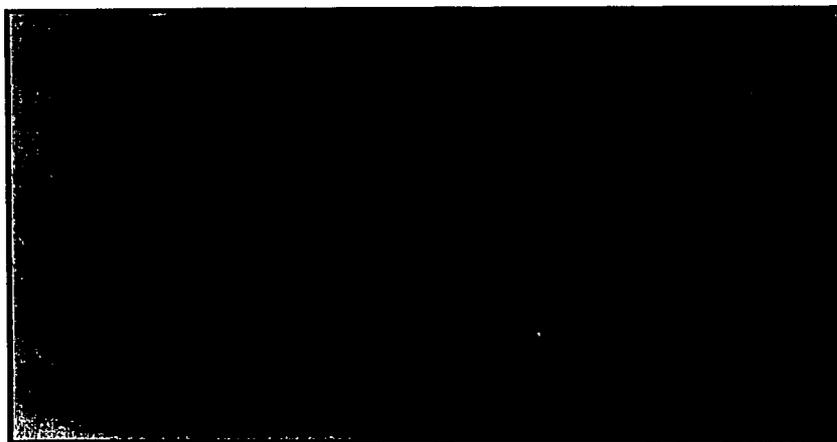


FIGURA 7: Inmunodetección del Receptor de Progesterona (RP) en células de tumor de mama con 5 días de cultivo. La señal se localiza en núcleo. La intensidad de marcaje varía de un núcleo a otro. 400X

INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS EN CULTIVO

	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3
Receptor de Estrógeno- α ---	+	+	+
Receptor de Estrógeno - β ---	+++	+++	++
Receptor de Progesterona---	+++	+++	+++
Citoqueratinas -----	++++	++++	++++

TABLA 2: Detección Inmucitoquímica de Receptores de Estrógeno α , β , Receptor de Progesterona y Citoqueratinas. Las cruces indican el número de células con tinción positiva por cada 100 células. 0: 0%, +: 1-25% ++: 26-50% +++: 51-75% +++++: 76-100%

Las células se incubaron con los fármacos y como puede observarse en las gráficas de viabilidad (Fig. 8), existe una diferencia de entre el 10 al 20% de mortalidad celular en la población tratada con los fármaco con respecto a las no tratadas y no existe mucha diferencia entre el porcentaje de muerte inducida por el 5- Fluoracilo (5-FU), la Epirubicina (EPI) o la combinación de los fármacos (5+E). Para determinar el tipo de muerte que se presentó en las células, se utilizaron los diferentes marcadores ya descritos.

En los tres tumores se observaron diferentes patrones de activación lisosomal evidenciada por la detección de la enzima lisosomal fosfatasa ácida (fig. 9 a - b y 10 a - b).

Tumor 1

En el tumor 1 se detectó el 95% de células positivas a Fosfatasa Ácida a las 2 horas de incubación con la epirubicina y la combinación de los fármacos y a las 6 horas el 100% de las células dieron positivo a este marcador, mientras que con el

5-FU solo el 60% de las células dieron positivo a las 6 horas (Fig. 11, Tumor 1). El ADN extraído de estas células se encontró con alto peso molecular en el corrimiento por electroforesis (Fig. 12 Tumor 1). El marcaje de TUNEL, que detecta los extremos 3' libres en el ADN (Fig. 13) reveló que solo el 20 % de las células tratadas presentó rupturas en la cadena del ADN (Fig. 14 Tumor 1), aunque al ser analizado con una técnica mas sensible, como lo es la técnica de cometas, (Fig.15) se encontró que cerca del 45 % de la células presentó rupturas de doble cadena y el 20% de cadena sencilla (Fig. 16 Tumor 1). Estos datos indican que por la activación de la Fosfatasa Ácida y la baja cantidad de rupturas del ADN las células del tumor 1 mueren en su mayoría por autofagia.

Para comprobar que las células del tumor 1 incubadas con los fármacos mueren por autofagia, se prepararon células para Microscopía Electrónica de Transmisión y se encontró la presencia de los cuerpos intracitoplasmicos que definen este tipo de muerte, los autofagosomas con cuerpos de mielina (Fig. 17 a - b).

Tumor 2

En este tumor, la fosfatasa ácida se encontró en el 50% de las células a las 6 horas después del tratamiento con la combinación de los fármacos, como resultado de un posible sinergismo entre ellos, mientras que cada uno por separado no tuvieron efectos tan dramáticos como en el tumor 1 (Fig.11 Tumor 2). En la electroforesis (Fig. 12 Tumor 2) el ADN se encontró en la mayoría de los casos con alto peso molecular, a excepción del carril 5 (5FU+EPI 2h) donde se encontró un ligero patrón de degradación del ADN. El marcaje con TUNEL solo mostró rupturas de ADN en el 10% de las células tratadas en todos los tiempos

(Fig. 14 Tumor 2), sin embargo, la técnica de cometas reveló un incremento de rupturas de doble cadena a las 2 horas del 40 al 60% de las células tratadas (Fig. 16 Tumor 2), lo que podría explicar el barrido presente en el gel de agarosa a este tiempo.

Estos resultados revelan que las células del tumor 2 mueren tanto por apoptosis como por autofagia y que además, estas células no son tan sensibles a estos fármacos como las del tumor 1.

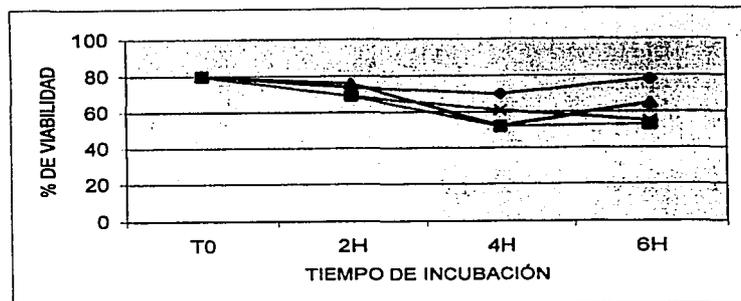
Tumor 3

En el tumor 3 no se detectó actividad de fosfatasa ácida en ningún tiempo ni con ningún fármaco, lo que indica que no existió activación lisosomal característica de la muerte autofágica (Fig. 11 Tumor 3). La electroforesis del ADN mostró alto peso molecular (Fig. 12 Tumor 3). Con el TUNEL, entre el 20 y el 35% de las células tratadas fueron positivas, siendo las incubadas con Epirubicina la que mayor número de rupturas de ADN tuvieron (35%) (Fig. 14 Tumor 3). Con la técnica de cometas se encontró que el 70% de las células tratadas presentaron rupturas de doble cadena y el 40% presentaron rupturas de cadena sencilla (Fig. 16 Tumor 3) lo que demuestra que las células de este tumor mueren por apoptosis.

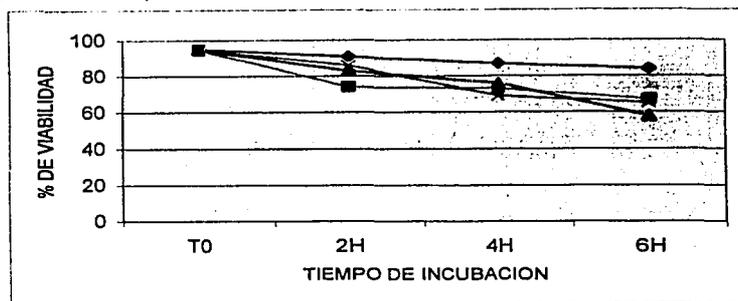
En todos los tumores no se detectaron células en necrosis probablemente debido a que la concentración del fármaco está por debajo de la media que existe en un paciente tratado con éstos.

FIGURA 8: GRÁFICAS DE VIABILIDAD

TUMOR 1



TUMOR 2



TUMOR 3

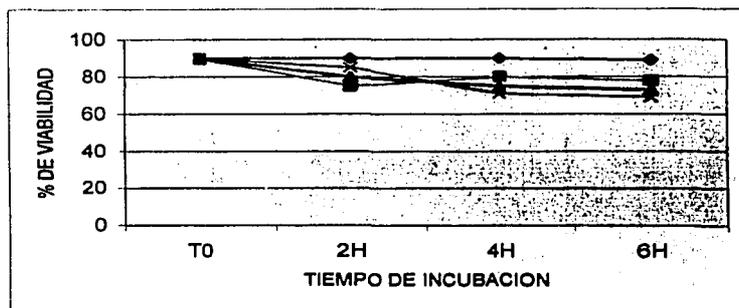


FIGURA 6: Las células se incubaron con los fármacos 5- Fluoracilo (6 μ g/ml), Epirubicina (0.04 μ g/ml) y la combinación de ambos además del control sin la adición de fármaco. Se midió la viabilidad a las 2, 4 y 6 horas para ver el efecto de los fármacos y se observó que en las células tratadas la viabilidad disminuyó entre el 10 y 20% en comparación con las incubadas sin fármaco.

◆ Control ■ 5-fluoracilo ▲ Epirubicina × Combinación 5-FU+EPI



FIGURA 9a: Cultivo de Células de mama. Control negativo sin fármaco con 6 horas de incubación y teñidas para detectar la presencia de fosfatasa ácida lisosomal. La reacción es negativa. Se observan gran cantidad de nucleólos, característica típica de las células neoplásicas. 400X



FIGURA 9b: Cultivo de Células de mama incubadas durante 6 horas con 5-fluoracilo y teñidas para detectar la presencia de fosfatasa ácida lisosomal. La detección se visualiza en rojo con localización citoplásmica en forma de gránulos. 1000X



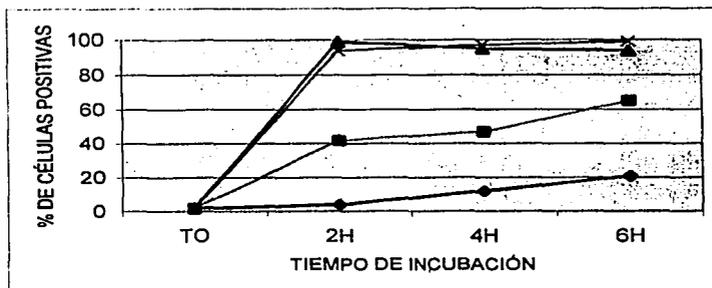
FIGURA 10a: Frotis de Células de mama sin fármaco con 6 horas de incubación y teñidas para detectar la presencia de fosfatasa ácida lisosomal. Nótese la ausencia de reacción. 1000X



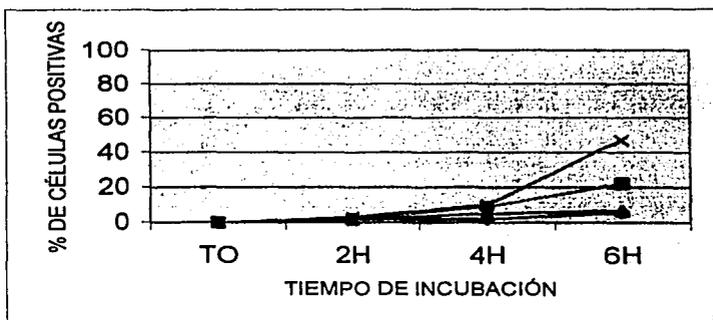
FIGURA 10b: Frotis de Células de mama incubadas 6 horas con epirubicina y teñidas para detectar la presencia de fosfatasa ácida lisosomal con intensa reacción positiva en la mayoría de las células. 400X

FIGURA 11: GRAFICAS DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA

TUMOR 1



TUMOR 2



TUMOR 3

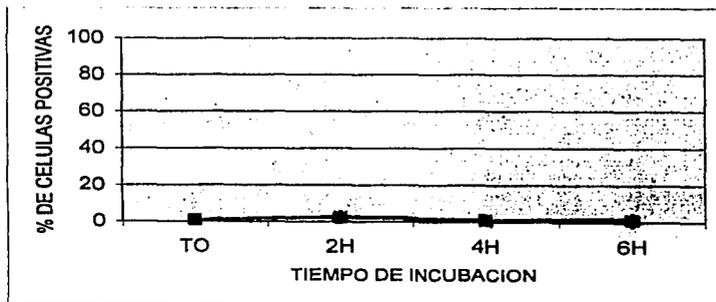


FIGURA 11: Las células se incubaron con los fármacos 5- Fluoracilo (6 μ g/ml), Epirubicina (0.04 μ g/ml) y la combinación de ambos además del control sin la adición de fármaco. Se detectó la actividad de la enzima lisosomal fosfatasa ácida a las 2, 4 y 6 horas. Los tres tumores respondieron de manera diferente al tratamiento, el tumor 1 tuvo detección alta de la enzima, el tumor 2 mediana y el 3 baja.

◆ Control ■ 5-fluoracilo ▲ Epirubicina ✕ Combinación 5-FU+EPI

FIGURA 12: ELECTROFORESIS DE ADN

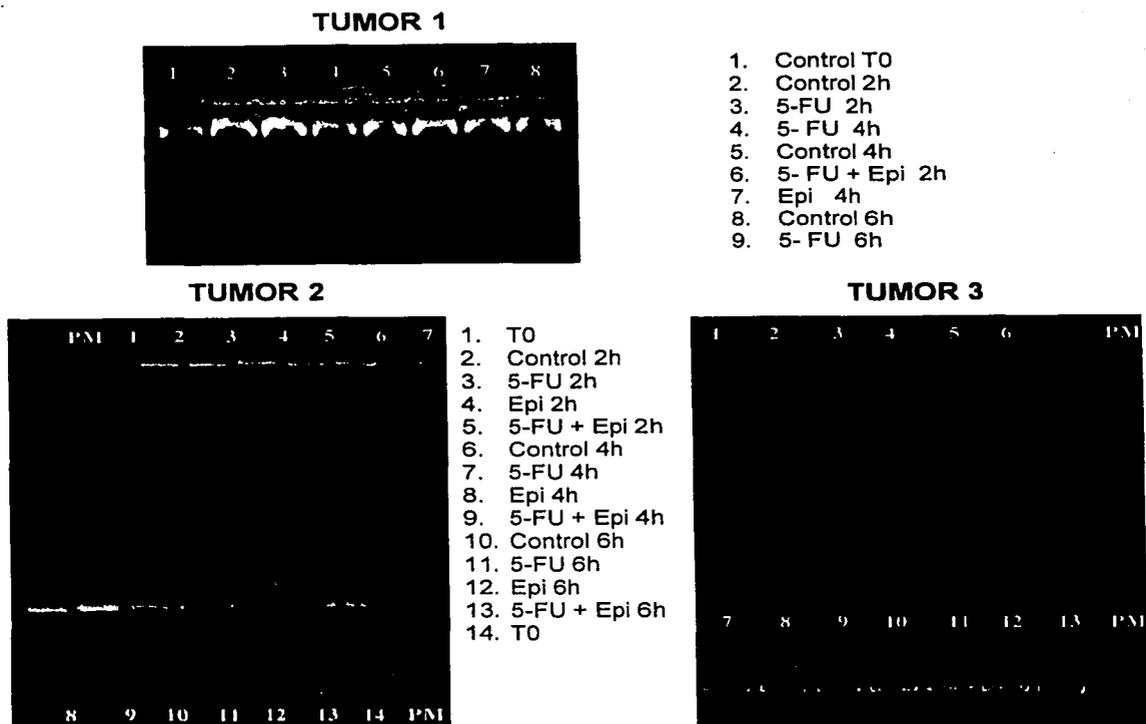


FIGURA 12: Electroforesis del ADN de las células tratadas. En la mayoría de los casos, el ADN permaneció con alto peso molecular (no degradado) a excepción del tumor 2 donde las células incubadas con la combinación de los fármacos por 2 horas, presenta un ligero barrido. (5-FU, 5-Fluoracilo; Epi, Epirubicina)

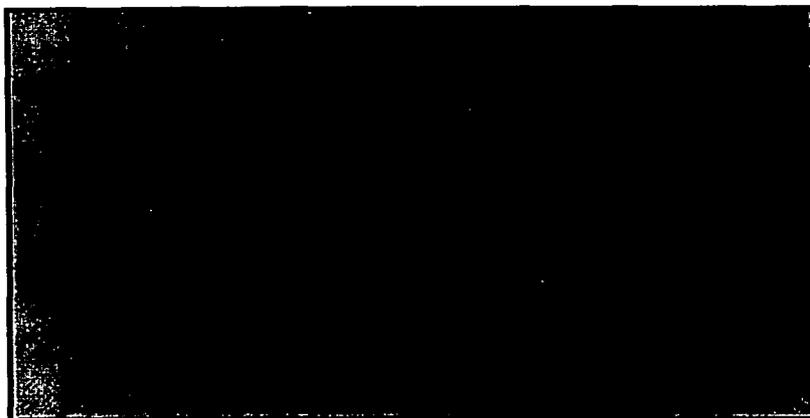
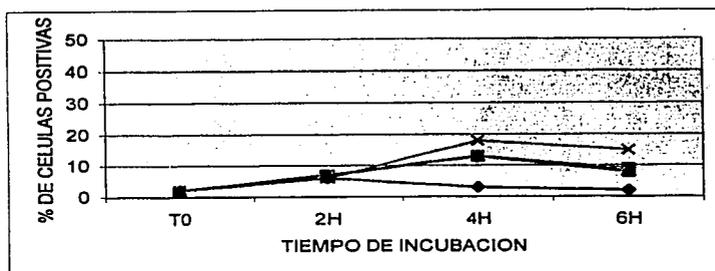


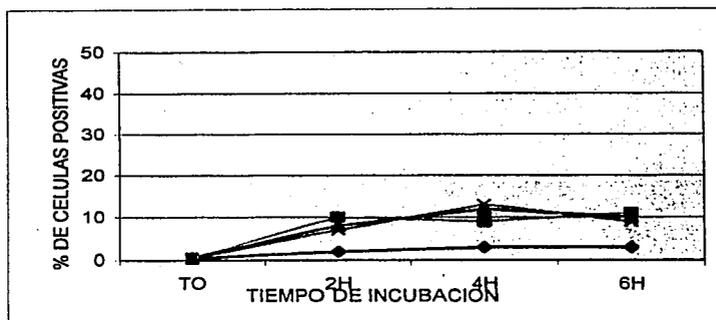
FIGURA 13: Detección de extremos 3' libres (TUNEL) en células de tumor de mama con 5 días de cultivo tratadas con $6\mu\text{g/ml}$ de 5 - FU. El núcleo de la izquierda es positivo y se nota la compactación nuclear con respecto a la célula negativa de la derecha, además en esta última se observa la cromatina dispersa. 1000X

FIGURA 14: GRAFICAS DE TUNEL

TUMOR 1



TUMOR 2



TUMOR 3

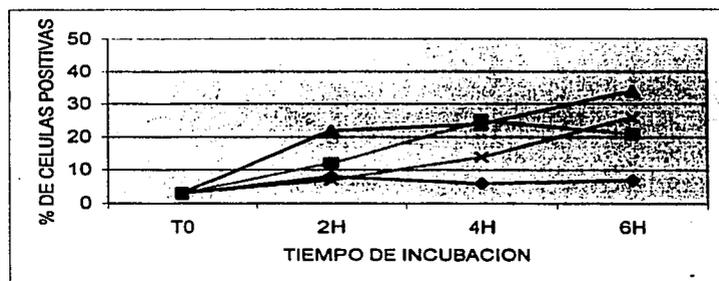
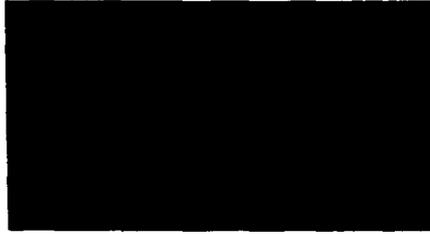


FIGURA 14.: Se detectó el rompimiento del ADN utilizando la técnica de TUNEL, a las 2, 4 y 6 horas de incubación. El porcentaje de células positivas varió entre los tumores. La mayor detección en el tumor 1 fue 20% con la combinación de fármacos, el 2: 10% con todos los fármacos, y el 3: 35% con la Epirubicina. En todos los casos, el control no superó el 5%.

◆ Control ■ 5-fluoracil ▲ Epirubicina × Combinación 5-FU+EPI



A

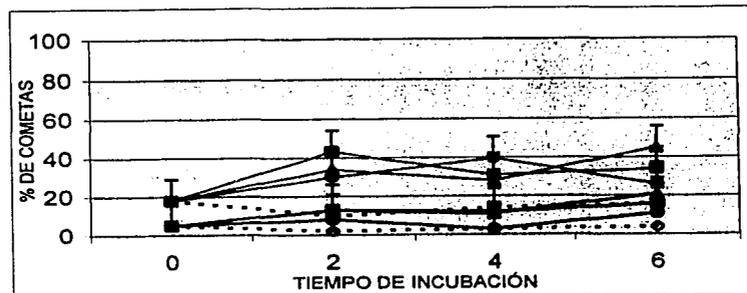


B

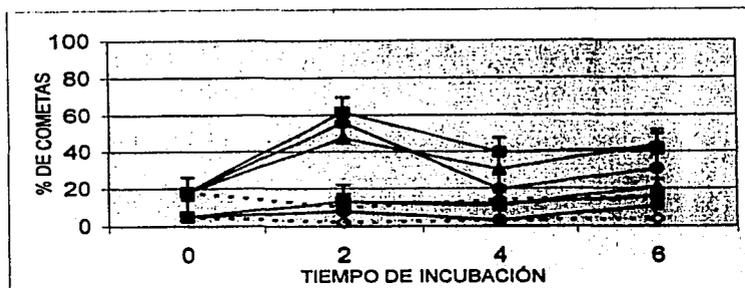
FIGURA 15: La técnica de cometas permite identificar rupturas de ADN en células aisladas. A) Células control sin adición de fármacos, el ADN permanece intacto dentro del nucleóide (cabeza del cometa) posterior al corrimiento electroforético. B) Células tratadas con epirubicina con 6 horas de incubación, el ADN degradado sale del nucleóide y forma la cola del cometa. Dependiendo del pH al que se lleve a cabo la electroforesis, se evidencian las rupturas de cadena sencilla (pH 10) y las de doble cadena (pH 8.3) por la aparición de la "cola" del cometa.

FIGURA 16: GRAFICA DE PORCENTAJE DE COMETAS

TUMOR 1



TUMOR 2



TUMOR 3

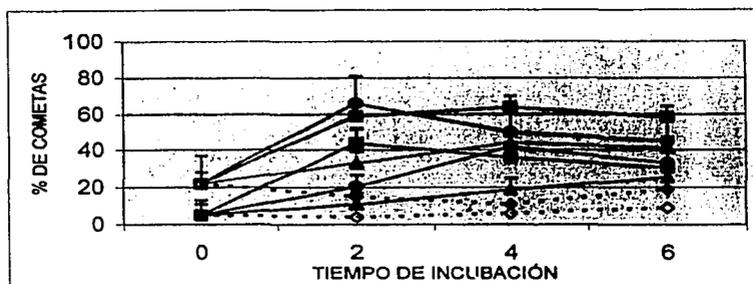


FIGURA 5: Las células tratadas con los fármacos se prepararon para la técnica de cometas, donde se hace una electroforesis de células aisladas. Las líneas rojas representan las rupturas de doble cadena (dc) presentes en las células tratadas. Las líneas verdes las rupturas de cadena sencilla (cs) y las negras las rupturas en las células controles.

▲ 5FU-DNAcs ● EPI-DNAcs ■ 5FU + EPIcs ▲ 5FU-DNAc ● EPI-DNAc ■ 5FU + EPIc
 ◆ Control-DNAcs ◇ Control-DNAc



FIGURA 17a: Las células del tumor 1 fueron tratadas con la combinación de los fármacos, 5- fluoracilo y Epirubicina y procesadas para Microscopía Electrónica de Transmisión. Se pueden observar la formación de autofagosomas como resultado con el tratamiento con los fármacos (Indicados con flechas) estas estructuras son características de la muerte celular programada por autofagia. 33400 X (Nu, núcleo; Rer, retículo endoplasmico rugoso)



FIGURA 17b: Amplificación de las vacuolas autofágicas (Autofagosomas) características de la muerte autofágica (Flechas negras) presentes en el tumor 1. También pueden observarse vacuolas vacías (flechas blancas) y las mitocondrias (M) intactas como ha sido descrito para este tipo de muerte. 55600 X

Discusión

El establecimiento de cultivos primarios de células provenientes de biopsias de cánceres de mama presenta dificultad, debido a la gran tasa de replicación de los fibroblastos que forman parte de los tumores, y aunque en la actualidad existen diversas técnicas para aislar a las células epiteliales (Ethier, 1993; Shanaz, 1997) nunca se logra tener un cultivo con el 100% de células epiteliales (Speirs, 1998), siendo común obtener alrededor de 60 al 90% de células epiteliales.

El uso de cultivos primarios (es decir, que no han experimentado una transferencia o pasaje, desde su establecimiento) ofrece mejores resultados para conocer la biología del tumor, ya que la selección clonal que existe en las líneas celulares establecidas no siempre es representativa de las características y comportamiento del tumor original.

Uno de los procesos mas estudiados en los últimos años es la muerte celular programada la cual es un fenómeno esencial en el desarrollo y madurez de los organismos multicelulares, además de tener un papel fundamental en diferentes estados patológicos.

En la actualidad se conocen dos tipos de muerte celular programada, la apoptosis y la autofagia, y no se descarta la existencia de otras formas (Bursh, 2001) y se sabe que se pueden presentar por diferentes situaciones, pero hasta la fecha no se sabia si los fármacos antineoplásicos que tradicionalmente se consideraron inductores de apoptosis y necrosis, también pudieran inducir autofagia.

LA APOPTOSIS Y LA AUTOFAGIA COMO TIPOS MAS FRECUENTES DE MUERTE CELULAR

En el presente estudio se analizó el tipo de muerte celular que inducen los fármacos antineoplásicos (apoptosis, necrosis o autofagia) en un mismo tipo celular y en un mismo paciente.

En una primera aproximación, la detección de muerte por la exclusión de azul de tripano fue muy baja. Es posible que el número de células muertas haya sido mayor, pero que la determinación de la viabilidad por esta técnica no haya podido detectarlas debido a la fragmentación que sufren al final del proceso de muerte y solo se detecten aquellas células muertas que aún no se hayan fragmentado.

En la mayoría de los casos, al aislarse el ADN de las células tratadas y control, se encontró que este permanecía como ADN de alto peso molecular consistente con las características de la autofagia y contrario a la apoptosis donde se espera la formación de la escalera de ADN, característica que define a este tipo de muerte (Arends, 1990; Lawrence, 1993, Bursh, 2000), pero las diferentes técnicas utilizadas, permitieron identificar que en el tumor 1 las células mueren por autofagia, ya que se encontró una alta detección de la enzima fosfatasa ácida. En el tumor 2, se detectaron ambos tipos de muerte celular, apoptosis y autofagia, y en el tumor 3 solo se detectó la apoptosis. Vale la pena recordar que la degradación del DNA es un evento tardío en el fenómeno de la apoptosis por lo que el porcentaje de células en apoptosis puede aumentar si se utiliza un marcador mas temprano como la exposición de fosfatidilserina y además, que ambos tipos de muerte celular no son excluyentes, por lo que aunque se detecte

una preferencia por algún tipo de muerte en especial en cada tumor, no indica que no se presenten ambos tipos de muerte (Kitanaka, 1999; Bursch, 2000).

Es posible que el tipo de muerte dependa más de sensibilidad de las células para activar los diferentes programas de muerte, es decir de que no existan alteraciones en las vías de señalización de uno u otro patrón de muerte que del mecanismo de acción del fármaco.

La característica de heterogeneidad celular dentro de un tumor por la presencia de diferentes clonas que se van desarrollando durante el proceso carcinogénico, y el que la apoptosis y la autofagia son mecanismos de muerte no excluyentes explica el que se presenten ambos tipos de muerte en un mismo tejido.

La demostración de que los fármacos antineoplásicos 5-Fluoracilo y Epirubicina pueden inducir tanto apoptosis como autofagia en cultivos cortos de células derivadas de tumores de mama, tiene gran implicación en la clínica, ya que hasta el momento solo se consideraba a la apoptosis y a la necrosis como tipos de muerte celular, pero ahora queda claro que la autofagia también está presente e incluso, puede servir como un marcador pronóstico para el tratamiento del cáncer. Finalmente, aunque el efecto de estos fármacos a las concentraciones y tiempos de incubación empleados ya se han probado con anterioridad y se observó que eran capaces de reducir el número de unidades formadoras de colonias (Von Hoff, 1990), no se descarta la posibilidad de que sea necesario un tiempo de incubación más prolongado, ya que por el mecanismo de acción de los fármacos se hace necesario que las células se encuentren en determinadas fases del ciclo celular. Esto puede explicar en parte la baja inducción de muerte causada por el 5-FU con respecto a la EPI, ya que la acción del primero depende de que la célula

esté en la fase S del ciclo celular, mientras que el segundo no es ciclo dependiente.

CONCLUSIÓN

- La apoptosis y la autofagia son dos tipos de muerte celular programada que pueden presentarse en células aisladas de tumores de mama y tratadas *in vitro* con agentes antineoplásicos utilizados en la quimioterapia de esta enfermedad.
- Estos dos tipos de muerte no son excluyentes por lo que se les puede encontrar en células del mismo tumor.
- La muerte de las células por una u otra vía va a depender de la sensibilidad de las células para activar los diferentes programas de muerte, es decir, que no existan alteraciones en las vías de señalización de uno u otro patrón de muerte.
- La demostración de que la autofagia esta presente en las células tratadas, tiene particular relevancia, ya que hasta el momento solo se consideraba a la apoptosis y a la necrosis como los tipos de muerte responsables de la regresión tumoral.

PROGRAMA DE TRABAJO

Células

CÉLULAS EN CULTIVO

Tratadas

5-FU
Epirubicina
5-FU + EPI
C(-) S/fármaco

DETECCIÓN DE:

❖ Morfología
❖ Fosfatasa ácida
❖ Tunel
❖ DNA

APOPTOSIS	AUTOFAGIA	NECROSIS
❖ Morfología	❖ Morfología	❖ Morfología
❖ Fosfatasa ácida (-)	❖ Fosfatasa ácida	❖ Fosfatasa ácida (-)
❖ Tunel (+)	❖ Tunel (-)	❖ Tunel (+)
❖ DNA (escalera)	❖ DNA (sin degradar)	❖ DNA (degradado)
❖ Cometas DN	❖ Cometas	❖ Cometas

APENDICES

1.- TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA

Las laminillas se ponen en una cámara húmeda durante el tiempo que dure cada paso para evitar que en alguno se sequen y se cubren con un cuadro de plástico flexible para que el líquido se esparsa uniformemente.

1. Una vez que se hizo la recuperación de antígenos (10 seg en el microondas con buffer de citratos pH 6.0) se le coloca a cada laminilla peróxido al 3% (Aprox. 100 μ l) durante 5 min. Para bloquear la peroxidasa endógena. [si el peróxido esta concentrado se diluye con metanol]
2. Se lavan con PBS 10mM/Tritón (0.5%) por 3 min.
3. Se repite paso 1 y 2.
4. Se bloquea las uniones inespecíficas con suero de asno (Santa Cruz Biotechnology) (aprox. 2 gotas) durante 10 min.
5. Lavado.
6. Se coloca el anticuerpo primario aprox. De 80 – 100 μ l. El tiempo de incubación varía de acuerdo al anticuerpo pero se obtienen buenos resultados con 1:30 hrs. De incubación. [Los anticuerpos de estrógeno total y progestágeno vienen previamente diluidos, en el caso de los de ER- α , ER- β y Citokeratinas, el anticuerpo se diluye en proporción 1:50 en PBS 10mM]
7. Lavado con PBS 10mM.
8. Se coloca el anticuerpo secundario aprox. De 80 – 100 μ l durante 1hr. **IMPORTANTE!!!!** Checar la especificidad del anticuerpo de acuerdo al primario, rata, ratón, cabra, conejo, etc.
9. Lavado
10. se aplica por 15 minutos el anticuerpo de unión que esta biotinilado.
11. lavado
12. Se aplica la estreptavidina conjugada con la enzima (peroxidasa)
13. Se revela con diaminobencidina (DAB) aprox. 80 μ l, y se monitorea al microscopio hasta que se marque de manera eficiente. Una vez marcado se enjuaga con agua corriente.
14. Se contratiñen con hematoxilina o verde de metilo.
15. Se montan con resina.

2.- TÉCNICA DE FOSFATASA ACIDA

Muestras

Cortes De 5 – 10 μm sin fijar o cortes de criostato fijados en formol frío agarosa calcio/goma, improntas o frotis.

Soluciones stock

1. Pararosanilina-HCL
 - Pararosanilina 1g
 - Agua destilada 20ml
 - HCL concentrado 5 ml

Se disuelve la pararosanilina en agua destilada y se le añade el HCL. Se calienta la solución ligeramente, se enfría, se filtra y se guarda en alícuotas en el refrigerador.

2. Nitrito de sodio
 - Nitrito de sodio 2g
 - Agua destilada 50ml

Esta solución tiene que prepararse en fresco o hacerse alícuotas de 0.4 ml y guardarse a -70°C

3. Buffer Veronal-Acetato
 - Acetato de sodio 3.88 g
 - Barbitol de sodio 5.88 g
 - Agua destilada 200 ml

4. Naftol AS MX fosfato
 - Naftol AS MX fosfato 50mg
 - Dimetil formamida 5 ml

Se hacen alícuotas de 0.5 ml y se guardan a -70°C

PREPARACIÓN DE LA SOLUCION DE INCUBACIÓN

- Pararosanilina – HCL (1) 0.4 ml
- Nitrito de sodio (40 mg/ml) (1) 0.4 ml

Se añade la pararosanilina gota a gota a el nitrito de sodio, agitando constantemente hasta que la solución tenga un color amarillento (incubar 1 minuto a temperatura ambiente antes de mezclarlo con el naftol)

- Naftol AS MX fosfato (3) 0.5 ml
- Buffer veronal – acetato (4) 2.5 ml

- Agua destilada 6.5 ml

Se mezcla muy bien todo lo anterior y se le añade la solución de pararosanilina/nitrito de sodio. Ajustar el pH a 4.7 - 5.0, filtrar y usar inmediatamente.

METODO

- Incubar las muestras de 10 a 60 min. A 37°C
- Lavar bien con agua destilada y después con agua corriente
- Contra teñir con verde de metilo o hematoxilina
- Lavar
- Deshidratar y montar

RESULTADOS

[REDACTED]

COMENTARIOS

Es importante lavar bien las muestras después de la incubación ya que la acidez de la solución puede provocar que la tinción con hematoxilina sea turbia. [REDACTED] algunos puntos de la solución de incubación se [REDACTED] el proceso ya que esto significa que el nitrito de sodio y la pararosanilina no han reaccionado adecuadamente. El medio de incubación debe tener un color ligeramente opalescente.

3.- PROPIEDADES DEL 5- FLUORACILO

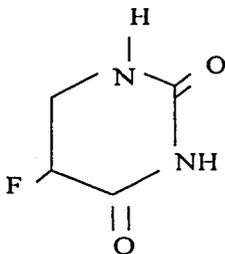
El fluoracilo se desarrolló en 1957 basado en las observaciones de que las células tumorales utilizan la base Uracilo para la síntesis del ADN con mayor eficiencia que las células normales de la mucosa intestinal. El 5 – fluoracilo es una pirimidina fluorinada, que es metabolizada intracelularmente a su forma activa, la Fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP). La forma activa inhibe la síntesis del ADN inhibiendo la producción normal de timidina.

El 5 – Fluoracilo es una droga específica a la fase S del ciclo celular.

Esta droga se usa en:

- ✓ Cáncer de mama
- ✓ Cáncer colorectal
- ✓ Cáncer gástrico
- ✓ Cáncer pancreático
- ✓ Cáncer cervical
- ✓ Etc.

ESTRUCTURA DEL 5 - FLUORACILO



4.- PROPIEDADES DE LA EPIRUBICINA

La epirubicina es un estereoisomero de la doxorubicina en el cual, el grupo hidroxilo en la posición C-4' del amino azucar está epimerizado.

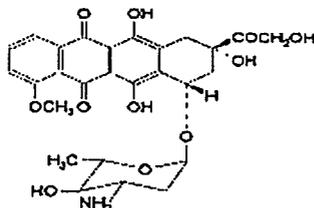
Al igual que otras antraciclinas, el mecanismo de acción preciso de la epirubicina es desconocido, pero se relaciona primariamente a la intercalación del anillo planar con el ADN y la subsecuente inhibición de la síntesis tanto de ADN como de ARN.

La epirubicina es un medicamento no específico de alguna fase del ciclo celular.

Esta droga se usa en:

- ✓ Cáncer de mama
- ✓ Cáncer gástrico
- ✓ Enfermedad de Hodgkin
- ✓ Cáncer de ovario
- ✓ Cáncer de páncreas
- ✓ Sarcomas.

ESTRUCTURA DE LA EPIRUBICINA



BIBLIOGRAFIA

1. Aita VM, Liang XH, Murty V, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, William C, Levine B. (1999) Cloning and genomic organization of Beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 59; 59-65
2. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. (1990) Apoptosis. The role of endonucleasas. *Am J Pathol*. 136: 593 – 608.
3. Benítez-Bribiesca L. (1998) Assessment of apoptosis in tumor growth: importance in clinical oncology and cancer therapy. In: When cells die. Editores: Lockshin RA, Zakeri Z and Tilly J. Wiley – Liss, USA 504 pp
4. Benítez-Bribiesca L, Sanchez P, Toledo J, Peñaroja R, Flores M, Sosa J. (2001) Differential staining of DNA strand breaks in dried comet assay slides. *J Histochem Cytochem*. 49: 921- 922
5. Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol*. 66: 13 - 14
6. Bursch W. (1996) active cell death induced by the anti- estrogens Tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 17 : 1595 – 607
7. Bursch W, Ellinger A, Gerner CH, Fröhwein U, Schulte-Hermann R. (2000) Programed Cell Death (PCD) Apoptosis, Autofagic PCD, or others?. *Ann New York Acad Sci*. 96 : 1 – 12
8. Bursch W, Hochegger K, Török L, Marian B, Ellinger A, Schulte-Hermann R. (2000) Autofagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci*. 113, 1189 – 1198

9. Bursh W. (2001) the autophagosomal – lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8: 569 – 581
10. Cotran R, Kumar V, Robbins S. (1994) *Robbins' pathologic basis of disease.* 5 ed. W B Saunders Company. USA. 1400 pp.
11. De Laurenzi V, Melino G. (2000) The little devil of death. *Nature.* 406 135 – 136.
12. Eastman, A. and Rigas, J.R., (1999) Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol* 26 (sup 16): 7 - 16.
13. Enari, M. (1998) A caspase- activated Dnase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43 – 50
14. Evan GI, Vousden KH. (2001) proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature insight.* 411 342 - 348
15. Ferri K, Kroemer G. (2000) Control of apoptotic DNA degradation. *Nature Cell Biol* 2: E63 – E64.
16. Freshney, I R. (1972) Tumour cells disaggregated in collagenase. *The Lancet.* September 2, 488 – 489
17. George M,D. (2000) Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to – vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Mol Biol Cell.* 11 (3): 969 – 82
18. Goldstein J, Waterhouse N et al. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biol* 2: 156 – 162

19. Hayat MA. (1986) Cell in culture, specific preparation methods in basic Techniques for transmission electron microscopy. Academic Press. London. 296 – 297
20. Henics T, Wheatley D. (1997) Vacuolar cytoplasmic phase separation in cultured cells involves the microfilament network and reduces motional properties of intracellular water. Int J Exp Path. 78 343 – 354.
21. Henics T, Wheatley D. (1999) Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. Biol Cell. 91 : 485 – 98
22. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 26: 239 - 257
23. Kitanaka C, Kuchino Y. (1999) Caspase – independent programmed cell death with necrotic morphology. Cell Death Differ. 6: 508 - 515
24. Klionsky D, Scott E. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290 : 1717- 1721
25. Lasfargues Y. E. (1975) New approaches to the cultivation of human breast carcinomas. In: Human tumor cells in vitro, Jorgen Fogh editor. Plenum press.
26. Lavin, M. (1993) Programmed cell death. Harwood academia pub. USA. 331pp.
27. Lawrence D. 1994. Tumor suppressor gene p53 and apoptosis. Cancer bull. 46 161 – 166.
28. Lawrence S, Smith S, Jones M, Osborne B. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?, Proc. Natl. Acad. Sci. 90. 980 – 984

29. Lee CY, Baehrecke EH (2001) Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*. 128: 1443 - 1455
30. Liang X H, Jackson S, seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoos H, Levine B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin 1. *Nature*. 402 : 672 – 6
31. Liu XS, Zou H, Slaughter C. Wang XD. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase -3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175 – 184.
32. Lockshin R. Zakeri Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Rev. Mol Cel Biol*. 2: 545-550
33. Lohrum, M ; Vousden, K. (2000) Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol*. 10: 197 – 202.
34. Lowe S, Lin A. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21: 485 - 495
35. Luzheng X, Fletcher G, Tolkosky A. (1999) Autophagy is activated by apoptotic signaling in sympathetic neurons: An alternative Mechanism of death execution. *Mol Cell Neuroscience*. 14: 180 – 198.
36. Majno G, Joris I. (1995) Apoptosis, Oncosis and Necrosis: An Overview of Cell Death. *Am. J. Path.* 146: 3 – 15.
37. Majno G, Joris I. 1996. *Cells, Tissues and Disease: Principles of general pathology*. Blackwell Science. USA. 974 pp
38. Martinou J, Desagher S, Antonsson B. (2000) Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nature Cell Biol*. 2: E 41- E 43

39. Martinou J, Green D. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 2: 63 – 67
40. Mattson M. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 1: 120 – 129
41. McIlroy D. (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.* 14: 549 - 558
42. Meyn, R et al.,(1994) Programed cell death in normal development and disease. *The cancer bull.* 46 (2): 120 - 124.
43. Ohsumi Y, (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Rev. Moll. Cell. Biol.* 2: 211 – 216
44. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. (2001) a novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61: 439 - 444
45. Reed JC. (2000) Mechanisms of apoptosis. *AJP.* 157: 1415 – 1430
46. Rojas E, López M, Valverde M. (1999) Single cell electrophoresis assay: methodology and aplications. *J Chromatogr B.* 727: 225 – 254.
47. Seglen P,O. (1990) Non-selective autophagy. *Semin Cell Biol.* 1(6)441-8
48. Sen S., (1992) Programed cell death: Concept, mechanism and control. *biol Rev.* 67. 287 - 319 .
49. Shanaz H.(1997) Partial enzyrnatc degradation of stroma allows enrichr-ment and expansion of primary breast tumor cells. *Cancer Res.* 57: 1590 - 1596.
50. Shunji C, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y.

- (1999) Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase – independent cell death program in human cancer cells. *Oncegene*. 18 2281 - 2290
51. Speirs V. (1998) Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumors, *Br. J Cancer*. 78: 1421- 1429
52. Sperandio S, Belle I, Bredesen D. (2000) An alternative, nonapoptotic form of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 14376 – 14381
53. Uchiyama Y (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol*. 64 (3): 233 – 246.
54. Von Hoff D, Sandbach J, Clark G, Turner J, Forseth B, Piccart M, Colombo N, Muggia F. (1990) Selection of cancer chemotherapy for a patient by an In Vitro assay versus a clinician. *J Natl. Cancer Inst.* 82 (2) Jan 17 110 – 116
55. Waguri S, Kohmura M, Gotow T, Watanabe T, Ohsawa Y, Kominami E, Uchiyama Y. (1999) The induction of autophagic vacuoles and the unique endocytic compartments, C-shaped multivesicular bodies, in GH4C1 cells after treatment with 17-beta- estradiol, insulin and EGF. *Arch Histol Cytol* 62: 423 – 434
56. Williams D. (1994) Barka's method for acid phosphatase . en: *Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory methods in histotechnology*. Editores, prophet E, Mills B, Arrington J y Sobin L. American Registry of pathology, USA, 279 pp
57. Willie AH, et al., (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68: 251 - 306

58. Wu Y. (2000) NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* Dnase II homolog functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes & Dev.* 14: 536 – 548.
59. Yasuda M, Okabe T, Itoh J, Takekoshi S, Hasegawa H, Nagata H, Osamura R, Watanabe K. (2000) Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: Application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCL₄) and dimethylnitrosamine (DMN). *J Histochem Cytochem.* 48: 1331 . 1339
60. Zamzami N, Kroemer G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Rev Moll Cell Biol.* 2: 67 - 71

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**