



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN
INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

“Efecto de la eritropoyetina en la muerte
celular inducida por quimiofármacos
empleados en el tratamiento de cáncer
cervicouterino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

IDALIA CLAUDIA ROJAS BARRERA

TUTORA: DRA. LETICIA ROCHA
ZAVALETA

MÉXICO, D.F.
2010

AGOSTO





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

Por este conducto le informamos que la tesis titulada **“Efecto de la eritropoyetina sobre la muerte celular inducida por quimiofármacos empleados en el tratamiento de cáncer cérvicouterino.”** que presenta la alumna **IDALIA CLAUDIA ROJAS BARRERA**, con número de cuenta **406051002** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dra. Claudia Gómez Acevedo

Dra. Patricia Victoria Torres Durán

Dra. Julieta Rubio Lightbourn

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por el apoyo, la asesoría, las enseñanzas y su paciencia, que permitieron la realización de este trabajo.

Al jurado integrado por:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

Dra. Claudia Gómez Acevedo.

Dra. Patricia Torres Durán.

Dra. Julieta Rubio Lightbourn.

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

A la M. en C. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico y su participación activa a lo largo de todo el trabajo.

A mis padres, mi hermana y mi tía Ade, por su cariño, la educación y el apoyo brindados a lo largo de toda mi vida.

A las personas que se han convertido en parte de mi familia... Rodolfo, Gaby, Guillermo, Lilian y Sandra

A todos mis amigos por su cariño, los buenos momentos y la amistad incondicional.

A la Bióloga María José Vázquez Mellado-Petit por la asesoría teórica y técnica brindadas.

A mis compañeras de laboratorio por la ayuda y compañerismo mostrados.

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

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

AREEs	Agentes Recombinantes Estimuladores de la Eritropoyesis
AEC	Anemia de Enfermedades Crónicas
AP1	Proteína activadora 1
CaCu	Cáncer Cervicouterino
CytC	Citocromo C
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DL	Dosis Letal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Epo	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de Eritropoyetina
5-FU	5-Fluorouracilo
Hb	Hemoglobina
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HSIL	Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado
JAK	Cinasa Janus
JNK	Cinasa del Amino Terminal de c-Jun
LCR	Región Larga de Control
LSIL	Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado
MAP	Mitogen-Activated Protein
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF- κ B	Factor Nuclear-kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Radioterapia
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Cáncer cervicouterino	3
2.2 Historia natural de la enfermedad	3
2.3 Estrategias para el tratamiento del cáncer cervicouterino.	8
2.3.1 Esquemas alternos de quimioterapia para el tratamiento de cáncer cervicouterino recurrente y/o metastásico	9
2.3.2 Cisplatino	9
2.3.3 Carboplatino	10
2.3.4 Oxaliplatino	11
2.3.5 Doxorubicina	12
2.3.6 Daunorubicina	13
2.3.7 5-Fluorouracilo	13
2.3.8 Metotrexato	14
2.3.9 Vinblastina	14
2.3.10 Ifosfamida	15
2.4 Apoptosis	15
2.5 Efectos secundarios de la quimioterapia	19
2.6 Anemia	20
2.6.1 Anemia en pacientes con cáncer cervicouterino	20
2.6.2 Tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer	22
2.7 Papel fisiológico de la eritropoyetina y su receptor	23
2.8 Efectos de la administración de Epo a pacientes con cáncer	27

2.8.1 Papel de la Epo y el EpoR en cáncer cervicouterino	29
III. ANTECEDENTES	31
IV. JUSTIFICACIÓN	32
V. HIPÓTESIS	32
VI. OBJETIVO GENERAL	33
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	33
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1 Material biológico, quimiofármacos y eritropoyetina	34
7.2 Cultivo celular	34
7.3 Ensayo de MTT	34
7.4 Determinación de la DL50 de los quimiofármacos	35
7.5 Ensayos para determinar el efecto de Epo sobre la muerte inducida por quimiofármacos	36
7.6 Determinación de la actividad de Caspasas	36
7.7 Análisis estadístico	37
VIII. RESULTADOS	38
8.1 Determinación de las dosis letales cincuenta (DL ₅₀)	38
8.2 Determinación del efecto de la Epo humana recombinante, sobre la muerte inducida por los quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu	40
8.3 Determinación de la actividad enzimática de caspasa-3	45
8.4 Determinación de la actividad enzimática de caspasas iniciadoras y efectoras	47
IX. DISCUSIÓN	53
X. PERSPECTIVAS	63

XI. CONCLUSIONES	65
XII. APÉNDICES	67
XIII. REFERENCIAS	68

I. RESUMEN.

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es una neoplasia de células del epitelio escamoso o del epitelio cilíndrico del cuello del útero. Según la Organización Mundial de la Salud, el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial, con 555 100 nuevos casos en 2007 y una tasa de mortalidad superior al 50%. El 80% de los casos de CaCu corresponden a países en vías de desarrollo. En México en el año 2008, se presentaron 10 186 casos nuevos de CaCu de los cuales 5 061 (49.6 %) fueron decesos (GLOBOCAN 2008).

Aunado al cáncer, las pacientes suelen mostrar diferentes síndromes paraneoplásicos, siendo la anemia el más frecuente. Se ha reportado que un 30% de las pacientes con CaCu tienen niveles de hemoglobina menores o iguales a 12 g/dL al iniciar el tratamiento, además de ello la anemia ha sido ligada a un mal pronóstico en la evolución de pacientes con CaCu.

Existen dos estrategias principales para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer. La primera consiste en las transfusiones sanguíneas, sin embargo, la principal desventaja de este método es la transmisión de agentes infecciosos. La segunda estrategia es el uso de la eritropoyetina humana recombinante. La eritropoyetina es una glicoproteína que previene la apoptosis, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea, y es producida en el riñón adulto bajo un mecanismo sensible a los niveles de oxígeno.

En diferentes tipos de cáncer el receptor para eritropoyetina se expresa de manera funcional, lo cual ha sido relacionado con cánceres más agresivos, a lo anterior se suman reportes que han observado que factores de crecimiento hematopoyéticos y la eritropoyetina, protegen a las células tumorales de la muerte celular inducida por quimiofármacos. A la fecha se han documentado efectos negativos al administrar eritropoyetina durante el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de cabeza y cuello; sin embargo, otros estudios refutan tales observaciones y argumentan que la anemia por sí

misma constituye un factor relacionado a un pobre pronóstico, y por tal razón el tratamiento de la misma constituye una prioridad.

En nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia del receptor de eritropoyetina en líneas celulares de CaCu, y se ha observado que la eritropoyetina promueve la proliferación en líneas celulares de CaCu, y que en algunos casos la eritropoyetina protege a las células de CaCu de la muerte celular inducida por algunos quimiofármacos.

Durante este trabajo, nos dedicamos a ampliar el espectro de quimiofármacos empleados para tratar el CaCu combinados con diferentes concentraciones de eritropoyetina. Nuestros resultados muestran que el efecto protector de la eritropoyetina depende del régimen de quimioterapia empleado, pues esta hormona puede proteger o sensibilizar a las células de CaCu a la quimioterapia. Por otra parte hemos observado que los efectos de la eritropoyetina no dependen de un incremento de la actividad de caspasa-3 y que a su vez esta hormona puede regular de manera negativa la actividad de las caspasas-8, -9 y 10 cuando se combina con daunorubicina; y a pesar de ello promover una mayor citotoxicidad del quimiofármaco. En conjunto nuestras observaciones, apoyan la hipótesis de que la eritropoyetina ejerce un efecto diferencial sobre las células de CaCu expuestas a quimioterapia, y sugieren que la eritropoyetina puede ser empleada en el tratamiento de anemia en pacientes con CaCu, siempre y cuando se combine con quimiofármacos en los que no interfiera con el tipo de muerte celular inducida por éstos.

II. INTRODUCCIÓN.

2.1 Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una neoplasia de células del epitelio escamoso o del epitelio cilíndrico en el cuello del útero. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial, con 555 100 nuevos casos en 2007 y una tasa de mortalidad superior al 50% (García M et al., 2007). El 80% de los casos de CaCu corresponden a países en vías de desarrollo (Stat bite, 2006). En México en el año 2008, se presentaron 10 186 casos nuevos de CaCu de los cuales 5 061 (49.6 %) fueron decesos (GLOBOCAN 2008).

El 99.8% de los casos de CaCu están asociados al Virus del Papiloma Humano (VPH). Los VPHs son agentes de transmisión sexual y están clasificados en dos grupos principales; los VPHs de bajo riesgo, que sólo producen verrugas, mientras que la infección con VPHs de alto riesgo (VPHs-AR), en particular VPH 16 y 18, es el factor de riesgo más importante para desarrollar lesiones precancerosas o cancerosas del cuello uterino (Walboomers et al., 1999). A nivel mundial el VPH-16 se ha relacionado con el 54% de los cánceres cervicales invasivos y el VPH-18 con el 17%.

La infección con VPH es un evento muy común, se ha estimado que la prevalencia a nivel mundial de la infección con VPH en mujeres, se sitúa entre un 2 a un 44% (Bosch and de Sanjose, 2003). Además de ello, estudios que combinan la detección de DNA viral y anticuerpos contra proteínas de la cápside del VPH, han demostrado que más del 50% de la población de mujeres sexualmente activas, han sido infectadas por uno o más tipos de VPHs en algún punto de sus vidas (Baseman JG, Koutsky LA, 2005). A la fecha se han clasificado 15 tipos de VPH como VPHs-AR para el desarrollo de CaCu, 3 han sido clasificados como *probablemente de alto riesgo*, 12 han sido clasificados como de *bajo riesgo* (VPHs-BR) y 3 se consideran de *riesgo indeterminado* (Muñoz et al., 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los VPHs, de acuerdo a su capacidad oncogénica (Muñoz et al., 2003).

Clasificación	Tipos de VPH
Alto Riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Alto Riesgo probable	26, 53, 66
Bajo Riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Riesgo	34, 57, 83
Indeterminado.	

2.2 Historia natural de la enfermedad.

Los VPHs pertenecen a la familia *Papillomaviridae* y están distribuidos extensamente en la naturaleza, han sido hallados en más de 20 especies de mamíferos, así como en algunas aves y reptiles. Debido a su importancia médica han sido extensamente estudiados, y se han identificado más de 100 tipos diferentes (Bernard, 2005). A pesar de ser un grupo numeroso, no todos los VPHs son capaces de infectar el tracto genital, los que tienen este tropismo están clasificados en el supergrupo A, también conocido como papillomavirus α (de Villiers et al., 2004; Myers et al., 1994).

El VPH es un virus de DNA circular de doble cadena, cuyo masa molecular es de aproximadamente 8 Kb y su genoma está dividido en tres regiones (Figura 1):

- La región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés): Formada por 400 pb, contiene secuencias que regulan la expresión de genes de las regiones temprana y tardía.

- La región temprana, que se denomina así porque alberga a las proteínas de expresión temprana en el ciclo de vida del virus: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las cuales están involucradas en los procesos de replicación y transformación.
- La región tardía, que alberga a los genes que codifican para las proteínas L1 y L2, que son proteínas estructurales de la cápside viral.

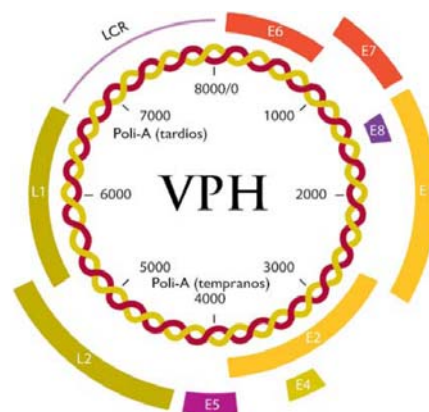


Figura 1. Genoma del VPH (Taylor and Francis Group, 2004).

Para que ocurra la infección con VPH se requiere del acceso de partículas virales a la capa basal del epitelio estratificado, por lo cual se piensa que es necesaria una microlesión. Se ha sugerido que, para que la lesión se mantenga, el virus debe infectar una célula troncal epitelial (Egawa, 2003; Schmitt et al., 1996). Con respecto al receptor al cual se une el VPH para internalizarse a la célula, se ha sugerido la dependencia de una α -integrina y de sulfato de heparan (Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999).

Posterior a la infección, se cree que el virus mantiene su genoma en forma episomal y con un bajo número de copias en las células basales del epitelio estratificado. El patrón viral de expresión no está bien definido, sin embargo, las evidencias apuntan a que las proteínas virales E1 y E2, se expresan para mantener el genoma viral de manera episomal (Wilson et al., 2002) y con esto promueven una correcta segregación durante la división celular. Es incierto si las proteínas transformantes E6 y E7 son expresadas en el epitelio basal (Crum CP et al., 1988); pues se ha sugerido que el

genoma viral está contenido en el epitelio basal en un rango que va de 10 a 200 copias por célula y que las proteínas tempranas (E1, E2, E6 y E7) son expresadas a niveles bajos (De Geest K et al., 1993; Stanley MA et al., 1989).

En un epitelio sano, las células basales se dividen quedando una en la capa suprabasal, ésta deja de dividirse y entra en un proceso de proliferación terminal (Madison et al., 2003). En cambio en un epitelio infectado por un VPH-AR, las oncoproteínas E6 y E7 trabajan juntas para que la célula epitelial infectada, entre de nuevo al ciclo celular. Ambas proteínas, E6 y E7, pueden unirse a reguladores del ciclo celular (Munger et al., 2001). E7 se une a la proteína pRb que es un regulador negativo del ciclo celular, encargado de evitar la entrada a la fase S del ciclo, pues secuestra al factor de transcripción E2F. Cuando E7 se une a pRb desplaza a E2F, lo cual lleva a la expresión de genes involucrados en la replicación de DNA. La proteína viral E6 complementa el papel de E7, uniéndose a p53 e impidiendo la inducción de apoptosis, E6 también puede unirse a otras proteínas proapoptóticas como Bak (Thomas and Banks, 1998) y Bax (Li and Dou, 2000). En cuanto a las proteínas tempranas E1, E2, E4 y E5, se cree que se expresan antes que E6 y E7, y que su función principal es mantener al genoma viral de manera episomal (Middleton et al., 2003).

Para la producción de viriones capaces de infectar otras células, el VPH debe amplificar su genoma y empaquetarlo en partículas virales, esto ocurre en la capa superior del epitelio estratificado. El VPH es un virus incapaz de romper las células infectadas, por lo tanto es liberado cuando las células epiteliales se descaman. Los VPHs son muy estables y resisten la desecación y congelación, de esta forma pueden ser transmitidos directamente a otros individuos.

Tanto los virus genitales oncogénicos como los no oncogénicos, pueden causar lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés), mientras que las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés), carcinoma *in situ* o cáncer invasivo, sólo son producidas por los VPHs-AR.

Una LSIL, consiste en manifestaciones transitorias de la infección viral productiva, el VPH se mantiene de manera episomal, las células muestran atipia coilocítica, alteración que por lo general revierte o puede mantenerse por un largo período; presentan mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del estrato epitelial, aunque las células epiteliales infectadas se diferencian y maduran. Por otro lado una HSIL, que es considerada como la lesión precursora del CaCu, ocurre cuando un VPH-AR infecta una célula inmadura con capacidad replicativa, el VPH evita la diferenciación y maduración del epitelio, lo cual desencadena una replicación continua, producida por los oncogenes virales E6 y E7, este proceso va acompañado de aberraciones genéticas, que en última instancia pueden llevar a la transformación de la célula infectada, la HSIL se caracteriza por una mayor actividad mitótica y un alto contenido de células inmaduras en los tercios central y superior del epitelio (Baseman JG and Koutsky LA. 2005)

Los pasos que se conocen para la carcinogénesis cervical incluyen: la infección con VPH-AR, el desarrollo una HSIL, la progresión a carcinoma *in situ* y posteriormente a un carcinoma invasor. La literatura sugiere que alrededor de uno o dos tercios de las mujeres con HSIL, desarrollarán un carcinoma invasor si no reciben tratamiento (Kinlen and Spriggs, 1978; Petersen, 1956). La edad promedio de la mujeres con CaCu invasivo se sitúa alrededor de los 50 años, mientras que la edad promedio de mujeres con HSIL es de 28 años, lo cual sugiere un estado precanceroso largo. Aunado a lo anterior, entre los factores de riesgo relacionados al CaCu, se encuentran: el número de compañeros sexuales (Burk RD et al., 1996; Tarkowski TA et al., 2004; Wang SS et al., 2004; Wheeler CM et al., 1993) el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales por largos períodos (Wang SS et al., 2003; Moreno V et al., 2002;), la infección con otros agentes de transmisión sexual (Smith JS et al., 2002) y la multiparidad (Hildesheim A et al., 2001). Por tanto el modelo de carcinogénesis que explica el CaCu, se considera un proceso multifactorial.

2.3 Estrategias para el tratamiento del cáncer cervicouterino.

El tratamiento del CaCu generalmente consiste en cirugía, la cual dependiendo del estadio de la neoplasia, puede ser acompañada de radioterapia y/o quimioterapia (Willmott LJ, Monk BJ. 2009). El tratamiento de pacientes con CaCu en etapas I o IIA consiste en radioterapia (RT) o histerectomía radical. Pacientes en etapas más avanzadas como IB también son candidatas a la histerectomía, sin embargo, algunas de ellas pueden requerir RT adyuvante cuando se llegan a encontrar células tumorales en los márgenes de nódulos linfáticos o invasión estromal profunda; estos tratamientos reportan tasas de supervivencia del 83% y una supervivida libre de recurrencia de 5 años en 74% de los casos (Landoni F et al., 1997; Landoni F et al., 2001). Para aquellas pacientes en estadios de CaCu más avanzados, se recomienda radiación pélvica externa y quimioterapia (QT) concurrente basada en una dosis semanal de cisplatino de 40 mg/m² durante 6 semanas (Grigsby P, Herzog T. 2002). A la fecha el cisplatino es el quimiofármaco más eficiente en el tratamiento de CaCu (Thigpen T, et al., 1981) y también se ha reportado que aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la RT (Szumiel I, Nias AHW: 1976).

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

A pesar de que el cisplatino es el quimiofármaco estándar para tratar el CaCu, se han implementado esquemas quimioterapéuticos alternos que buscan: mejorar la respuesta, incrementar las tasas de supervivencia y establecer nuevos esquemas para tratar el CaCu recurrente o metastásico, que puede llegar a ser resistente al cisplatino. Dichas estrategias pueden incluir al cisplatino combinado con otros quimiofármacos o excluirlo, y estar basados en esquemas dobles, triples y hasta cuádruples (Tao X et al., 2008) que abarcan los siguientes antineoplásicos: doxorrubicina (du Bois A et al.,

2007; Chen JR et al, 2008; Dowdy SC et al., 2002), vincristina, bleomicina (Ting-Chang Chang, 2000), 5-fluorouracilo (Eifel PJ, et al., 2004), carboplatino ([Nagai T](#) et al., 2008; Pectasides D et al., 2009; Yu L et al., 2009), oxaliplatino (Kuo DY et al., 2010), metotrexato (Dowdy SC et al., 2002) e ifosfamida (Zhang J et al., 2006). Debido a que la QT es una terapia sistémica que afecta a todas las células del cuerpo, y consiste en el uso de fármacos que inducen la muerte celular mediante diversos mecanismos, a continuación se detallan los mecanismos de inducción de muerte activados por algunos de los quimiofármacos incluidos en el tratamiento de CaCu.

2.3.2 Cisplatino.

El cisplatino fue descubierto por Rosenberg y colaboradores a finales de los sesenta, es ampliamente usado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre ellos se encuentran el cáncer testicular, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, y el CaCu (Rosenberg, 1999). A pesar de la eficacia del cisplatino, éste presenta varios efectos adversos, siendo uno de los más preocupantes la adquisición o presencia de clones resistentes en el tumor (Kelland LR. 1993). El cisplatino es un agente que causa daño al DNA, y se considera que éste es el primer paso en la inducción de citotoxicidad celular, pues la formación de aductos en el DNA induce muerte celular por apoptosis (Eastman A. 1999). El cisplatino entra a la célula a través de canales intermembranales (Gately DP & Howell SB, 1993), una vez dentro de la célula la concentración de cloro disminuye a ~20 mM y el fármaco es altamente hidratado, con lo cual adquiere una carga positiva y es capaz de interactuar con componentes nucleofílicos celulares. (Andrews P & Howell S.1990). Algunos componentes celulares con sitios nucleofílicos son el DNA, el RNA, proteínas, fosfolípidos de membrana, microfilamentos del citoesqueleto y grupos tiol (González VM. 2000). A pesar de que se acepta que el DNA es el blanco principal del cisplatino, hay evidencia de que otros blancos celulares pueden estar involucrados en la citotoxicidad de este

compuesto, que es capaz de unirse a los fosfolípidos de membrana, irrumpir en citoesqueleto y afectar la polimerización de actina (Jamieson ER & Lippard SJ. 1999). El cisplatino puede ocasionar la liberación del citocromo C de la mitocondria y la activación de la caspasa-3 (Kojima et al., 1998). Además se ha observado que en el osteosarcoma induce la activación secuencial de las caspasas-8,-3 y -6 (Seki et al., 2000). Sin embargo, también se ha reportado que induce muerte celular independiente de caspasas en células de cáncer de ovario (Henkels KM, Turchi JJ. 1999) y que cultivos celulares tratados con cisplatino pueden presentar muerte por apoptosis o por necrosis (Pestell KE et al., 2000), lo anterior re que dependiendo de la dosis y el estatus celular el cisplatino puede inducir muerte por apoptosis o por necrosis (González VM et al., 2001)

2.3.3 Carboplatino.

El carboplatino es un agente antitumoral de la familia del cisplatino, tiene un ciclobutano dicarboxilato bidentado, que reemplaza a las moléculas de cloro del cispatino y representa a la segunda generación de fármacos basados en platino. Presenta una menor nefrotoxicidad comparado con el cisplatino y atraviesa más fácilmente la barrera hematoencefálica (Riccardi R et al., 1992). El carboplatino es empleado en el tratamiento de neuroblastoma de alto riesgo (Matt KK et al., 1999), cáncer de ovario (Marsden DE et al., 2000) y CaCu (Pectasides D et al., 2009; Yu L et al., 2009); forma aductos con el DNA y uniones cruzadas DNA-proteínas, siendo éste el principal mecanismo de inducción de apoptosis. Se ha reportado que el carboplatino es capaz de activar a la caspasa-3 (Westfall SD, Skinner MK. 2005) sin embargo, los aductos formados por este quimiofármaco son menos citotóxicos que los formados por cisplatino (Micetich KC et al., 1985) y presenta resistencia cruzada con este quimiofármaco (Di Francesco AM et al., 2002).

2.3.4 Oxaliplatino.

El oxaliplatino fue introducido a la clínica en 1986 por Mathé y colaboradores, es un complejo coordinado de tercera generación basado en platino y se le clasifica en una familia diferente a la del cisplatino y carboplatino, pues no muestra resistencia cruzada con éstos y posee una menor toxicidad hematológica y gástrica (Misset JL. 1998). El oxaliplatino es empleado para tratar cáncer colorectal avanzado, cáncer de ovario (Misset JL et al., 2000) y se ha demostrado que es efectivo en el tratamiento de tumores de CaCu recurrente o metastásico (Kuo DY et al., 2010). El oxaliplatino posee un anillo ciclohexano 1,2-diamino, del cual carecen el cisplatino y carboplatino, que tiene efectos antitumorales y está encargado de promover la formación de aductos en el DNA. Los aductos formados por el oxaliplatino tienen un efecto citotóxico mayor que los formados por otros agentes basados en platino, debido a que son más efectivos bloqueando la replicación del DNA (Raymond E et al., 1998). Los aductos formados por este quimiofármaco son reconocidos y reparados por la vía de reparación y escisión de nucleótidos (Reed E. 2005). Rixe O y colaboradores (1996) demostraron que los perfiles citotóxicos de cisplatino y oxaliplatino son bastante diferentes, es de destacar que el anillo ciclohexano parece jugar el papel principal en las diferencias que existen entre estos fármacos. Otro estudio similar al anterior corroboró las diferencias de los perfiles citotóxicos y propuso un mecanismo de acción diferente para el oxaliplatino, el cual consiste en el ataque a los grupos tiol de las proteínas recién sintetizadas, como principal vía de inducción de muerte celular (Meynard D et al., 2007). Además de ello se ha reportado que en líneas celulares de cáncer colorectal, el oxaliplatino activa a la caspasa-3, inhibe a survivina y potencia la apoptosis y catástrofe mitótica producida por paclitaxel en cáncer de colon (Fujie Y et al., 2005).

2.3.5 Doxorrubicina.

La doxorrubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, que ha sido empleado por más de 30 años en el tratamiento de tumores en cáncer de mama, ductos biliares, endometrio, esófago, hígado, osteosarcomas y

sarcomas de tejidos blandos (Murphy GP et al., 1995), también ha sido implementada en el tratamiento de el CaCu, sin embargo se han reportado resultados contradictorios respecto a su efectividad (du Bois A et al., 2007; Chen JR et al., 2008; Dowdy SC et al., 2002).

Su uso es limitado, pues está ligado a cardiomiopatía degenerativa irreversible y falla cardiaca congestiva (Olson RD et al., 1990 y Singal PK, Iiskovic N. 1998). A pesar de que la doxorrubicina es un antineoplásico ampliamente usado, el mecanismo de acción a través del cual induce muerte celular aún no es del todo claro. A la fecha se han propuesto varios mecanismos para los efectos citostáticos y citotóxicos de este antineoplásico, entre los cuales se encuentran: la intercalación en el DNA, unión cruzada de las hebras de DNA, formación de radicales libres e inhibición de la topoisomerasa II (Hortobagyi 1997). Así mismo, se ha reportado que la muerte celular inducida por doxorrubicina es dependiente de p53 y Fas (Muller et al., 1998), y que es capaz de activar a las caspas- 9, -8 y -3, lo que sugiere inducción de apoptosis (Seongeun L et al., 2002). La inhibición de la síntesis del DNA posiblemente está relacionada a los efectos citotóxicos de la doxorrubicina, mientras que la inhibición de la topoisomerasa II probablemente está ligada a los efectos letales de este antineoplásico.

2.3.6 Daunorrubicina.

La daunorrubicina es un antineoplásico de la familia de las antraciclinas empleado en el tratamiento de leucemia mieloide aguda (Wiernik PH & Dutcher JP. 1992). Los mecanismos por los cuales induce muerte celular son básicamente los mismos que los de la doxorrubicina, promueve la ruptura de la doble hebra de DNA, inhibe a la topoisomera II α (Tina E., 2009), estimula la formación de radicales libres, que tiene como consecuencia daño al DNA y membranas (Gewirtz DA, 1999), finalmente se ha reportado que la daunorrubicina induce apoptosis en células HeLaS3 (Skladanowski A, Konopa J. 1993).

2.3.7 5-Fluorouracilo.

El 5-fluorouracilo (5-FU) es empleado en el tratamiento del CaCu, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer colorectal y cáncer gástrico (Sayaka Y et al., 2008; Perry W et al., 2001; Lemos ML ed. 2006). El 5-FU es un antineoplásico que pertenece a la clase de los antimetabolitos, inhibe a la sintasa de timidilato y con ello provoca un desbalance en la producción de bases nitrogenadas, así mismo la fidelidad en la síntesis y reparación de DNA dependen en gran manera del adecuado suministro de bases nitrogenadas, el desequilibrio en la producción provocado por 5-FU también promueve la ruptura de las hebras maduras de DNA y posteriormente deviene la muerte celular, principalmente por apoptosis (Yoshioka A et al., 1985; Wataya Y et al., 1989; Oliver FJ et al., 1996) En cáncer de colon, la inducción de muerte celular por 5-FU es totalmente dependiente de p53 (Pritchard DM et al., 1997).

2.3.8 Metotrexato.

El metotrexato es un antagonista del ácido fólico, empleado como agente antineoplásico en el tratamiento de leucemia aguda linfoblástica, osteosarcoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, coriocarcinoma, linfoma de no Hodking y CaCu (Dowdy SC et al., 2002); además de ser empleado para tratar el cáncer también se usa para tratar la artritis reumatoide y otros procesos inflamatorios crónicos. El blanco principal del metotrexato es la dihidrofolato reductasa, se une a esta enzima y bloquea la reducción del hidrofolato a tetrahidrofolato, de este modo afecta las síntesis de purinas ribosiladas y pirimidinas desoxirribosiladas, pues inhibe dos pasos dependientes de folatos: el primero a nivel de la transformilasa en la vía de las purinas y el segundo a nivel de la timidilato sintetasa en la vía de las pirimidinas (Jackson RC, Grindey GB.1984; Fairbanks L et al., 1999). El desbalance en la cantidad de bases nitrogenadas interfiere con la síntesis de DNA, se ha observado que el metotrexato es capaz de inducir apoptosis en

células T activadas durante la fase S/G2 del ciclo celular (Genestier L et al., 1998) y adicionalmente puede inducir ruptura de una o dos hebras en el DNA, de manera indirecta interfiriendo con mecanismos de reparación del DNA.

2.3.9 Vinblastina.

El sulfato de vinblastina pertenece a la familia de los vinca alcaloides, es un potente inhibidor de la proliferación y se emplea en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer testicular, coriocarcinoma, linfoma de no Hodking y CaCu (Dowdy SC et al., 2002). La vinblastina interfiere con la dinámica de adición de tubulina y promueve la pérdida de los extremos de los microtúbulos, arresta el ciclo celular durante en la metafase debido a que evita la separación de las cromátidas hermanas (Palmer CG et al., 1960; Jordan MA et al., 1991) y es capaz de inducir catástrofe mitótica (Roninson IB et al., 2001). Asimismo se ha reportado que los agentes que evitan la polimerización de microtúbulos inducen apoptosis, mediante la fosforilación de bcl-2 (Wang LG et al., 1999), finalmente la vinblastina también puede interferir con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, bloqueando el uso del ácido glutámico.

2.3.10 Ifosfamida.

La ifosfamida es un agente antineoplásico de la familia de las oxafosforinas, se considera que es un profármaco, pues requiere ser metabolizada para producir la especie citotóxica encargada de inhibir la proliferación celular (Sladek NE. 1988), éste proceso ocurre en el hígado y es llevado a cabo por la familia de enzimas citocromo P450, la cual cataliza la conversión de la ifosfamida a un derivado denominado isofosforamida mostaza y acroleina (Chang T et al., 1993) La ifosfamida se emplea en el tratamiento de CaCu, cáncer de páncreas y sarcomas de tejidos blandos, es un agente alquilante, que se une al DNA causando uniones cruzadas entre sus hebras, lo que lleva

a la inhibición de la síntesis de DNA y finalmente a apoptosis (Zhang J et al., 2006).

A pesar de que los blancos de los diferentes antineoplásicos son variados y la determinación de su empleo en diferentes tipos de cáncer depende del tipo de neoplasia y de la condición del paciente. Como ya se ha descrito, el mecanismo de inducción de muerte celular, con el uso de varios antineoplásicos, es principalmente la muerte por apoptosis (Fisher DE. 1994).

2.4 Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso que permite a un organismo controlar el número de células, eliminando células innecesarias o dañadas (Hail N et al., 2006). La muerte por apoptosis ha sido implicada en el desarrollo embrionario, morfogénesis, regulación del sistema inmune, preservación de la homeostasis, así como en varios procesos patológicos. El proceso apoptótico posee una morfología característica que consiste en el encogimiento de la célula, condensación de la cromatina y la formación de vesículas en la membrana plasmática, que son denominadas cuerpos apoptóticos (Yashura S et al., 2003); el citoesqueleto colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y el DNA es cortado en pequeños fragmentos; aunado a lo anterior, la superficie celular es alterada desplegando señales que promueven que la célula sea fagocitada, antes de que cualquier contenido sea vertido al espacio extracelular, esto evita daño a las células circundantes y permite que los componentes celulares sean reciclados (Alberts B et al., 2002).

La mayoría de los cambios morfológicos durante la apoptosis son atribuidos a una familia de proteínas denominadas caspasas; las caspasas son proteasas de cisteína y de aspartato; a la fecha se han descrito once caspasas en humanos (Lamkanfi M et al., 2002), algunas de ellas no tienen un papel relevante en la apoptosis, mientras que otras participan en la ejecución de ésta y de otros eventos no apoptóticos (Tabla 2).

En la mayoría de las células sanas las caspasas se encuentran en su forma inactiva como zimógenos y presentan una baja actividad basal catalítica. Una vez que la señal proapoptótica ha sido recibida, las caspasas sufren una proteólisis que genera su forma activa.

Tabla 2. Funciones de las diferentes caspasas presentes en humanos.

Caspasa	Función
Caspasa-1	Interviene en la producción de IL-1b (Martinon et al.,2002) y participa en la muerte celular por piroptosis, que es desencadenada en presencia de toxinas bacterianas (Mariathasan S et al., 2006)
Caspasa-2 (iniciadora)	Juega un papel redundante en la vía intrínseca, induce la liberación de: CytC, Smac y el factor inductor de apoptosis, desde la mitocondria (Guo Y et al.,2002); forma parte del PIDDosoma, un complejo proteico similar al apoptosoma, (Tinel A et al.,2004).
Caspasa-3 (efectora)	Es activada por las caspasas-8 y -9, participa en las vías extrínseca e intrínseca, es la principal caspasa efectora,se encarga de cortar la gran mayoría de substratos celulares (Porter AG, Janicke RU;1999).
Caspasa-4	Se localiza en retículo endoplásmico y se ha propuesto que participa en la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico (Hitomi J et al., 2004).
Caspasa-5	Participa en la producción de IL-1b e inflamosoma (Martinon et al.,2002)
Caspasa-6 (efectora)	Es activada durante la apoptosis neuronal (Le Blanc A et al., 1999) y patologías como el Alzheimer (Klaiman G et al.,2008)
Caspasa-7 (efectora)	Cumple una función redundante a la de la caspasa-3, comparten gran cantidad de substratos e inhibidores (Salvesen G, Abrams JM. 2004)
Caspasa-8 (iniciadora)	Participa en la vía extrínseca iniciada por ligandos de muerte (FasL, TNF) (Juo P et al.,1998), en la diferenciación de macrófagos y formación de saco vitelino (Kang TB et al.2004)
Caspasa-9 (iniciadora)	Participa en la vía intrínseca, formando parte del apoptosoma, es regulada por Bcl-2 y BH-3 (Fuentes-Prior P et al., 2003)
Caspasa-10 (iniciadora)	Es un ortólogo de la caspasa 8, responde a Fas-L y TRAIL (Kishckel FC et al., 2001), media respuesta inflamatoria y antiviral dependiente de NFκB (Takahashi K et al., 2006)

Las caspasas que son activadas por complejos señalizadores se denominan caspasas iniciadoras y su activación es el punto de enlace entre la fase iniciadora y la efectora de la apoptosis. Las principales caspasas iniciadoras en mamíferos son: la caspasa-2, -8, -9 y -10. Las caspasas que requieren ser activadas por las caspasas iniciadoras, se denominan caspasas efectoras y éstas son las encargadas de degradar la mayoría de los substratos celulares, este proceso tiene como resultado la amplificación de la cascada proteolítica (Alberts B et al., 2002), en mamíferos las principales caspasas efectoras son la caspasa-3,-6 y -7, las cuales se encargan de cortar la lámina nuclear y a otras proteínas que mantienen en su forma inactiva a las enzimas encargadas de degradar el DNA (DNAsas), de esta manera la célula es desmantelada de manera rápida y segura.

Existen dos vías principales de apoptosis que requieren de la actividad de caspasas. La primera de ellas es la vía extrínseca y la segunda es la vía intrínseca o dependiente de la mitocondria (Figura 2).

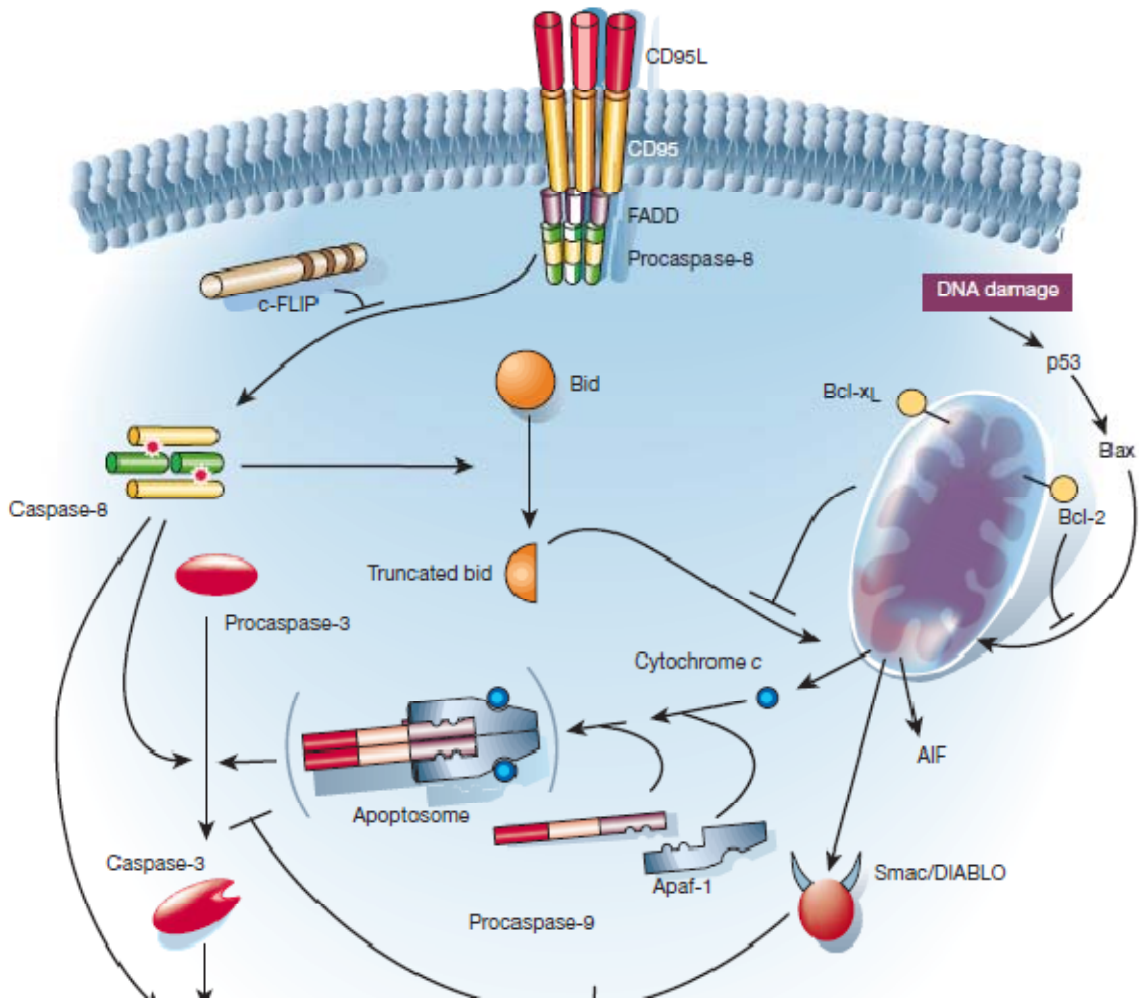


Figura 2. Las dos vías principales de muerte por apoptosis en mamíferos son la vía extrínseca activada por ligandos extracelulares e inicia con la activación de caspasa-8 y la vía intrínseca que es activada por la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria I (Hengartner MO. 2000).

La vía extrínseca, es activada por la unión de ligandos de muerte a su receptor, lo que promueve el reclutamiento de la caspasa-8 hacia el complejo señalizador inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) por medio de la proteína adaptadora FADD, este evento tiene como consecuencia la activación de la caspasa-8 (Boldin MP et al., 1996; Muzio M et al., 1996), que es capaz de activar a las caspasas efectoras, siendo la principal la caspasa-3.

En cuanto a la vía intrínseca, el evento principal es la liberación del citocromo C (CytC) de la membrana mitocondrial, una vez que el CytC se encuentra en el citosol éste se conjuga con Apaf-1 y la caspasa-9, para formar el complejo proteico denominado apoptosoma (Li P et al., 1997). Este complejo catalítico es capaz de activar a las caspasas efectoras-3 y -7.

2.5 Efectos secundarios de la quimioterapia.

Dado que la QT es una terapia sistémica, los agentes antineoplásicos entran al torrente sanguíneo y son capaces de alcanzar diferentes órganos y tejidos en el cuerpo, lo que tiene como consecuencia el daño temporal a órganos o tejidos que se encuentran en constante proliferación como la médula ósea, la mucosa gastrointestinal, gónadas y folículos pilosos. El daño a las células

sanas es temporal pues éstas cuentan con mecanismos de reparación más eficientes que las células tumorales.

Los efectos adversos causados por la QT dependen del tipo de antineoplásico, la cantidad recibida y la duración del tratamiento. Perry y Yabro (1984) han clasificado los efectos adversos de la QT de acuerdo a la temporalidad con que estos ocurren.

Aparición inmediata, se presentan en horas o días posteriores a la administración de la QT: náusea, vómito, flebitis, anafilaxia, falla renal, hipertensión o hipotensión, entre otros (Barton-Burke M et al., 2001).

Aparición temprana, se presentan en días o semanas posteriores a la QT: leucopenia, trombocitopenia, alopecia, estomatitis, diarrea y megaloblastosis, entre otros (Barton-Burke M et al., 2001).

Aparición retardada, se presentan en semanas o meses posteriores a la QT: anemia, aspermia, daño hepatocelular, hiperpigmentación, fibrosis pulmonar, entre otros (Barton-Burke M et al., 2001).

Aparición tardía, se presenta en meses o años posteriores a la QT: esterilidad, hipogonadismo, menopausia prematura y neoplasias secundarias, entre otros (Barton-Burke M et al., 2001).

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

2.6 Anemia.

La OMS define a la anemia, como niveles de hemoglobina (Hb) por debajo de 12 g/dL en mujeres y 14 g/dL en hombres. En raras ocasiones la anemia constituye una enfermedad por sí sola, generalmente es consecuencia de otro padecimiento como el cáncer. Algunos síntomas de la anemia son: debilidad, astenia, palidez, incremento en el ritmo cardíaco, etc. La anemia es una complicación frecuente en pacientes con cáncer y sus síntomas

pueden comprometer la calidad de vida del paciente y su capacidad para tolerar o responder ante el tratamiento contra el cáncer.

2.6.1 Anemia en pacientes con cáncer cervicouterino.

Se ha reportado que un 30% de las pacientes con CaCu tienen niveles de Hb menores o iguales a 12 g/dL al iniciar el tratamiento (Candelaria M et al., 2004); aunado a este dato la anemia ha sido ligada a un mal pronóstico en pacientes con CaCu (Evans y Bergsjø, 1965). Esta observación tiene su primer antecedente en el trabajo de Evans y Bergsjø publicado en 1965, el cual incluyó más de 1000 pacientes con CaCu, que fueron tratadas con radioterapia, en un período que abarcó de 1948 a 1958, en el Hospital Radium en Oslo. Las pacientes que fueron sometidas a radioterapia con niveles de Hb menores a 11 g/dL mostraron un menor sobrevida, comparadas con aquellas con niveles de Hb iguales o mayores a 11 g/dL, lo que permitió establecer una relación lineal entre los niveles de Hb y la sobrevida de las pacientes. Estudios posteriores han apoyado las observaciones de Evans y Bergsjø para CaCu y otras neoplasias sólidas (Bush RS, Girinski T. 1989; Frommhold H. 1998; Kapp DS. 1983; Pedersen D. 1995; Grau C. 1998; Caro JJ. 2001). En el metanálisis realizado por Caro JJ et al., 2001 se estableció que la anemia, constituye un factor pronóstico independiente, relacionado con un incremento en las tasas de mortalidad de varios tumores sólidos y neoplasias hematológicas. Las causas de la anemia asociada a procesos tumorales son múltiples, en ocasiones la anemia puede ser una consecuencia directa producida por el crecimiento del tumor o puede ser causada de manera indirecta a través de citocinas liberadas por el tumor o por el tratamiento del mismo.

Efectos directos del tumor.

Los procesos cancerosos pueden causar anemia de manera directa mediante:

- a) Hemorragias.

- b) Invasión de la médula ósea por células tumorales, lo cual interfiere con la producción de precursores eritroides.

Efectos indirectos del tumor.

En la mayoría de los casos, la anemia es un resultado indirecto del cáncer, la anemia asociada a padecimientos crónicos, es el tipo más común en pacientes con cáncer y puede ser resultado de múltiples factores como:

- a) Citocinas: Se cree que algunas citocinas producidas por el tumor como: la Interleucina-1, Interferones β y γ , Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) o Factor Transformante de Crecimiento β (TGF β); pueden provocar hemólisis autoinmune, o bien reducir la producción y capacidad de respuesta ante la eritropoyetina; generalmente este tipo de anemia se desarrolla lentamente (Barón González M, Gallego Ordóñez A, 2004).
- b) RT y QT: El tratamiento empleado en el manejo de pacientes con cáncer también ha sido involucrado en el desarrollo de la anemia. La RT y QT pueden suprimir la capacidad de la médula ósea para producir eritrocitos. Estudios han demostrado que entre el 10% y 40% de pacientes tratados con cisplatino desarrollan anemia. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos que inducen supresión de la médula ósea lo hacen a corto plazo, a pesar de ello existe evidencia que apoya la posibilidad de problemas a largo plazo en la producción de eritrocitos.
- c) Infecciones por inmunosupresión: Además de los efectos evidentes de la QT, la cual suprime la médula ósea, tal supresión también afecta al sistema inmune, lo cual puede resultar en infecciones que impactan en las funciones de la médula ósea, teniendo como resultado la anemia o una exacerbación de la misma.

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

2.6.2 Tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer.

Existen dos estrategias principales para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer. La primera, consiste en la transfusión de eritrocitos, sin embargo, esta presenta desventajas como la escasez de donantes y sobre todo el riesgo de exponer al receptor a agentes infecciosos como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Cummings PD et al., 1989) o el Virus de la Hepatitis C (Donahue JG et al., 1992), por otro lado puede incrementar el riesgo de recurrencia de la neoplasia, por la inmunosupresión inducida por la transfusión (Blumberg N et al., 1988).

La segunda estrategia para tratar la anemia es el uso de la eritropoyetina humana recombinante (Epo), la cual se encuentra disponible desde 1989 y fue aprobada en 1993 por la Food and Drug Administration para el tratamiento de la anemia en pacientes con tumores sólidos bajo regímenes de QT, no así para pacientes con neoplasias hematológicas. En 2002, la Epo hiperglicosilada, darbopoyetina α , también fue aprobada para el tratamiento de pacientes con cáncer que reciben QT; asimismo Agentes Recombinantes Estimuladores de la Eritropoyesis (AREEs) se han introducido al mercado europeo para su uso en la nefrología, oncología y cirugía (Jelkmann W et al., 2008). A diferencia de la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica, la anemia de enfermedades crónicas (AEC) en pacientes con cáncer es multifactorial y sólo una pequeña porción se debe a una deficiencia en la producción de Epo (Hodges VM et al., 2007). A pesar de lo anterior la administración de la Epo y sus análogos ha reducido substancialmente el número de pacientes que requieren de transfusiones sanguíneas y los riesgos asociados a éstas, pues en los últimos 20 años el manejo de la anemia ha cambiado de manera considerable y no es de sorprender que las ventas a nivel mundial de la Epo ascendieran a 4.3 billones de dólares en 2002, convirtiendo con esto a la Epo en la proteína recombinante empleada con fines terapéuticos más exitosa a la fecha (Barlett, D. L. & Steele, J. B. 2004).

2.7 Papel fisiológico de la eritropoyetina y su receptor.

La Epo es una glicoproteína de 30.4 kDa que previene la apoptosis, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea. La producción insuficiente de Epo es la principal causa de anemia en enfermedades renales crónicas, debido a que la Epo se produce principalmente en el riñón adulto, en las células intersticiales de la corteza renal (Koury ST et al., 1998), bajo un mecanismo que es sensible a los niveles de oxígeno (Beru N et al., 1986). La Epo regula una producción diaria de 2×10^{11} eritrocitos, lo cual mantiene la capacidad acarreadora de oxígeno a sangre periférica bajo condiciones fisiológicas (Jelkmann W, 1992). Los tejidos con bajos niveles de oxígeno inducen la expresión del gen de la Epo a través de la activación transcripcional y de la estabilización del mRNA de Epo (Ebert BL & Bunn HF, 1999). La regulación transcripcional de la Epo dependiente de hipoxia, es resultado directo de la activación del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1); HIF-1 se une a elementos de respuesta a hipoxia en el extremo 3' del gen de Epo (Beck I et al., 1993); además de la hipoxia hay otros factores que regulan la expresión de esta hormona como la hipoglucemia, niveles intracelulares elevados de calcio, liberación de insulina, estrógenos, esteroides androgénicos y varias citocinas (Jelkmann W, 1992).

El efecto de la Epo es mediado por la unión de la proteína a su receptor (EpoR), el cual se encuentra anclado a la membrana celular (Figura 3). El EpoR es una proteína de 507 aminoácidos con una masa molecular de 56 kDa, no posee actividad catalítica en la región intracelular y es miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I. La unión de Epo a EpoR provoca la dimerización de éste y tiene como consecuencia un cambio conformacional en EpoR, que promueve el acercamiento de las dos cinasas de tirosinas JAK2 (del inglés, Janus Kinase) previamente ancladas al receptor, de tal modo las dos cinasas JAK2 quedan en suficiente proximidad para fosforilarse y activarse de manera recíproca (Remy I et al., 1999). Una vez que las JAK2 se han activado, fosforilan residuos de tirosina en el EpoR, (Dusanter-Fourt et al., 1992, 1994) los cuales sirven para el anclaje de

proteínas señalizadoras con dominios SH2 (Figura 3). La unión de Epo a EpoR activa tres diferentes proteínas STAT (del inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription): STAT-1, STAT-3 y STAT-5. La proteína STAT-5 es requerida durante la eritropoyesis y es responsable del efecto antiapoptótico de Epo, pues promueve la expresión de Bcl-XL (Socolovsky M et al., 1999). En cuanto al efecto proliferativo de Epo, se ha reportado que promueve la división celular de las unidades formadoras de colonias eritroides tempranas (BFU-e) (Dessypris EN, et al., 1984), pues estimula mitógenos como c-myc (Umemura T et al., 1988), PI3-K (Damen JE et al., 1995) y las MAP cinas (Bittorf T et al., 1994; Sui X et al., 1998).

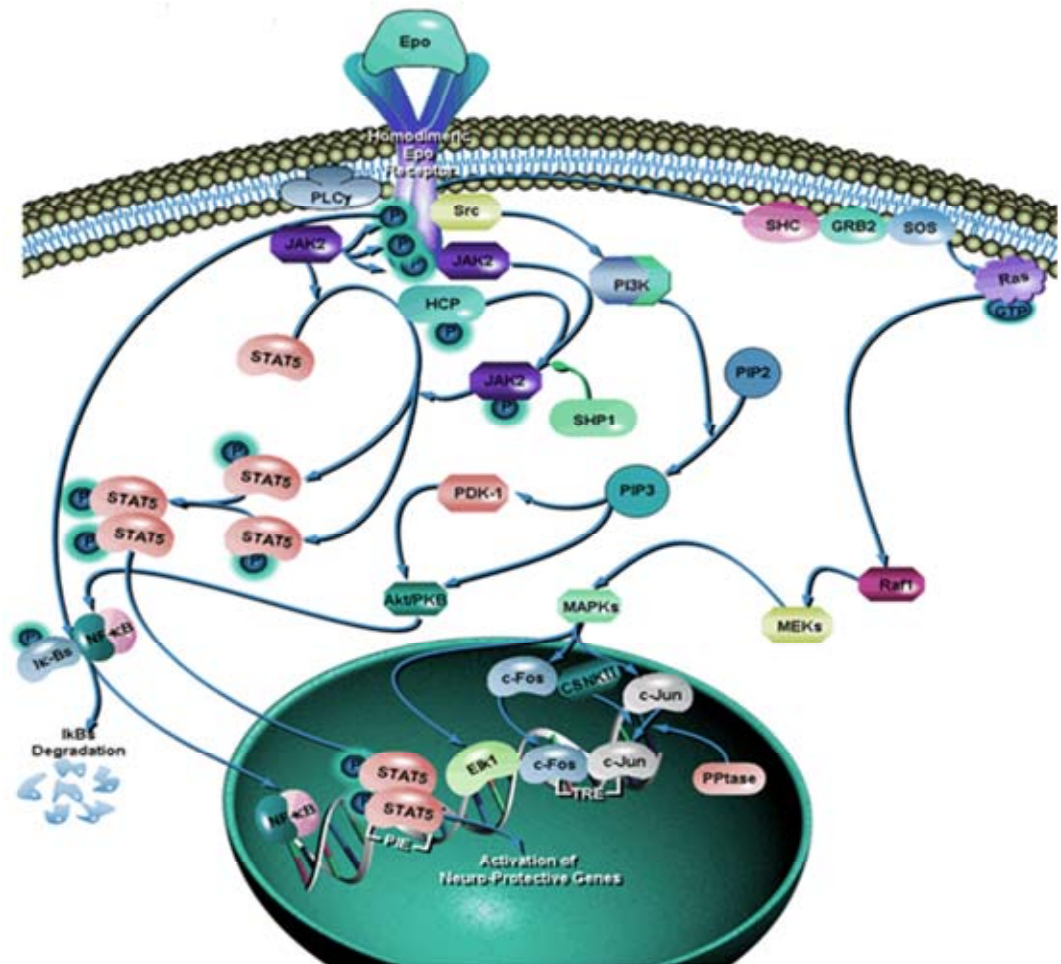


Figura 3. Cuando la Epo se une a el EpoR, se produce un cambio conformacional, que provoca el acercamiento y transfosforilación de las cinasas JAK2, ancladas previamente al receptor, una vez que han sido activadas las JAK2 se encargan de fosforilar diferentes residuos de tirosinas presentes en el EpoR, que sirven como sitio de anclaje para proteínas

con dominios SH2, como resultado varias vías son activadas entre ellas: PI3-K, STAT-5 y las MAPKs, las cuales participan en procesos de proliferación, sobrevivencia y diferenciación.

Dentro de la familia de las MAP cinasas, Epo es capaz de regular la vía de las ERKs, que está relacionada a procesos de mitogénesis o de diferenciación, activados por citocinas (Seger R y Krebs EG, 1995) y las vías JNK (del inglés, c-Jun amino-terminal kinases) y p38, asociadas a estrés celular y a eventos inductores de apoptosis (Paul A et al., 1997); es de destacar que la actividad de las ERKs parece ser opuesta a la actividad de las JNKs y p38 cuando las vías son cointegradas (Xia Z et al., 1995). También se ha reportado que otros receptores como el receptor para el factor de células troncales (SCFR) y el receptor para c-kit; son capaces de interactuar con el EpoR y potenciar la proliferación y diferenciación de células eritroides (Wu H et al., 1995; Wu H et al., 1997).

La señalización de EpoR es terminada como resultado de su interacción con ciertas proteínas, entre ellas SHP1 o HCP el principal regulador negativo de EpoR. La fosfatasa SHP1 es reclutada hacia el EpoR mediante su dominio SH2 y se une al residuo de tirosina fosforilada 429, para catalizar la desfosforilación de las JAK2 (Klingmuller U et al., 1995). Otro regulador negativo de la señalización de EpoR es la proteína Cis-1 que se une a la tirosina fosforilada 401, que constituye un sitio de anclaje para STAT-5, de este modo impide el anclaje de STAT-5 y se interrumpe la señalización de Epo (Matsumoto A et al., 1997).

La mayoría de los estudios acerca de la señalización de la Epo y su receptor se han realizado en linajes hematopoyéticos, pues anteriormente se pensaba que el efecto de la Epo se limitaba a estos grupos celulares. Sin embargo, estudios recientes han revelado que Epo es una hormona pleiotrópica, pues se ha reportado que también es producida en el hígado adulto el cual aporta el 20% de la producción de Epo (Lacombe C, Mayeux P. 1998); tejido neural (Masuda S et al., 1994), el tracto genital femenino (Yasuda Y, et al. 1998), placenta (Conrad KP et al., 1996) y testículos

(Magnanti M et al., 2001). De manera similar la expresión del receptor de EpoR no está limitada a los progenitores eritroides, sino que es posible observarlo en varias células sanas como: endotelio, células del sistema nervioso, mioblastos y megacariocitos (Farrell F, Lee A. 2004).

Sorpresivamente, varios trabajos han reportado que el EpoR también se expresa en biopsias o líneas celulares de cáncer de mama (Acs G et al., 2001), hígado (Batra S et al., 2003), pulmón, sistema nervioso (Batra S et al., 2003) y CaCu (Leo C et al., 2006); por mencionar algunos. Por lo que se ha sugerido que la administración de Epo para tratar la anemia de pacientes con cáncer, podría jugar un papel en la respuesta del tumor ante las terapias que se encargan de inducir apoptosis de las células tumorales.

2.8 Efectos de la administración de Epo a pacientes con cáncer.

La terapia con Epo recombinante se ha convertido en el estándar para tratar anemias de origen renal y no renal. En pacientes con cáncer la Epo mantiene los niveles de Hb, en niveles muy cercanos a los obtenidos con transfusiones sanguíneas. A pesar de lo anterior, desde que la Epo comenzó a ser empleada en el tratamiento de anemia en pacientes con cáncer, surgieron varias inquietudes acerca del papel que podría jugar una citocina con efectos antiapoptóticos en estos pacientes. Al respecto existe una gran controversia pues algunos grupos apoyan el argumento de que la Epo y los AREEs mejoran la calidad de vida del paciente y la respuesta a QT cuando no está basada en cisplatino (Littlewood TJ et al., 2001, Littlewood TJ et al., 2003), a la vez un análisis retrospectivo concluyó que el uso de Epo tiene efectos benéficos en diferentes tipos de cáncer, sin importar que la QT esté o no basada en cisplatino (Glaspay J et al., 2002). Sin embargo, una revisión realizado por Bottomley A y colaboradores en el 2002, hizo hincapié en la existencia de algunas deficiencias en los estudios que concluyen que el uso de la Epo mejora la calidad de vida de los pacientes.

Por otra parte, en 2003 otro estudio reportó que los pacientes tratados con Epo tienen 10 veces más riesgo de presentar un evento trombótico

comparados con pacientes que no reciben Epo. El incremento del riesgo de presentar eventos tromboticos no fue asociado a los niveles de Hb, edad, índice de masa corporal o conteos de leucocitos y plaquetas, lo que sugiere que la Epo es un factor independiente promotor de eventos tromboticos (Wun T et al., 2003). Adicionalmente los trabajos de Henke M et al., 2003 y Leyland-Jones B et al., 2005 realizados en pacientes con cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama respectivamente, concluyeron que a pesar de que la Epo incrementa los niveles de Hb, no mejora la respuesta al tratamiento, sino que al contrario tiene un impacto negativo sobre el control del tumor, así como en las tasas de sobrevivencia en pacientes tratados con RT y Epo. El grupo de Henke apela a la hipótesis de que la Epo podría activar vías antiapoptóticas; pero es importante señalar que al finalizar el estudio los niveles de Hb fueron de 14 g/dL en mujeres y 15 g/dL en hombres, lo que sugiere que el impacto negativo de la Epo podría deberse a un sobretratamiento, además de ello en este trabajo no se incluye ningún experimento que demuestre la presencia del EpoR o el posible efecto proliferativo de la Epo sobre el tumor. En cuanto al estudio de Leyland-Jones B, sus resultados muestran un aumento en la mortalidad en el grupo que recibió Epo, tal resultado fue atribuido a la progresión e incremento en la incidencia del cáncer en las pacientes tratadas con Epo, además de un incremento de los eventos tromboticos.

Con respecto a los metanálisis las conclusiones son igualmente controversiales. El primer metanálisis realizado por el grupo de Bohlius J (2005) incluyó 19 estudios clínicos con un total de 2 865 pacientes y observó una tendencia en el incremento de la sobrevivencia de pacientes tratados con AREEs. Sin embargo, la última actualización de dicho metanálisis (Bohlius J et al., 2009), la cual posee una cobertura más amplia (57 estudios clínicos que incluyeron un total 9353 pacientes), se observó un incremento en el ratio de riesgo asociado a sobrevivencia para los pacientes tratados con AREEs (Bohlius J et al., 2006; 2009). Por otro lado, un segundo metanálisis (Aapro M et al., 2008, 2009) que incluye 12 estudios clínicos con 2297 pacientes,

concluyó que el uso Epo no tiene impacto en la supervivencia o en la progresión del tumor, además no hallaron evidencia que relacione los altos niveles de Hb con un incremento en la mortalidad, la progresión de la enfermedad o eventos trombóticos.

Tomando en cuenta las evidencias clínicas, la Sociedad Americana de Oncología Clínica y la Sociedad Americana de Hematología (Rizo J et al., 2007), ha emitido una serie de recomendaciones con respecto al uso de Epo, éstas sugieren el uso de AREEs cuando la Hb está en niveles iguales o menores a 10 g/dL y para pacientes con bajo riesgo de mielodisplasia; también se aconseja monitorear los niveles de hierro, así como ser cautelosos con los regímenes de QT y estados clínicos asociados a eventos trombóticos.

2.8.1 Papel de la Epo y el EpoR en cáncer cervicouterino.

Del mismo modo que se ha reportado la expresión de Epo y EpoR en otros tejidos u órganos sanos, su presencia ha sido detectada en tumores de CaCu (Acs G et al., 2003, Hardee ME et al., 2006, Leo C et al., 2006; López V et al., observación no publicada). La principal consecuencia de la expresión de EpoR en CaCu, es el posible papel antiapoptótico que podría jugar cuando la Epo es usada en combinación con QT o RT. En 2003 Acs y colaboradores, demostraron que la expresión del EpoR es regulada positivamente por hipoxia en las líneas celulares HeLa y SiHa de CaCu, además reportan que la Epo inhibe de manera dosis dependiente el efecto citotóxico del cisplatino, fármaco estándar en el tratamiento de CaCu, y establecieron una correlación entre el grado de la lesión y la expresión del EpoR. En cuanto a la expresión de Epo, hallaron que ésta es mayor en las zonas de displasia, necrosis y queratinización comparadas con las zonas benignas (Acs G et al., 2003). Estos resultados son apoyados por otro estudio realizado en biopsias de pacientes con CaCu, en donde se observó por inmunohistoquímica que Epo estaba presente en un 88% y EpoR en un 92% de las biopsias analizadas; la expresión de Epo fue asociada a una reducción significativa en la

sobrevivencia de los pacientes, mientras que la expresión de EpoR fue relacionada al tamaño del tumor (Leo C et al., 2006).

Acerca de los estudios clínicos en pacientes con CaCu, que combinan el uso de Epo con la QT y/o la RT, los resultados continúan siendo inconcluyentes. Los estudios dirigidos por Lavey RS et al., (2004) y Temkin SM et al., (2006) reportan efectos adversos. En el estudio de Lavey y colaboradores se observa una disminución del 23% en la sobrevida total, en un grupo de 53 pacientes que recibieron un tratamiento que incluyó: Epo y hierro combinados con terapia estándar, además observaron un incremento notable en la presencia de eventos trombóticos profundos, por lo que recomiendan no incluir a la Epo en el tratamiento rutinario del CaCu. En cuanto al estudio de Temkin SM, el cual incluyó 68 pacientes: 50 en el grupo control y 18 en el grupo tratado con Epo, se observó una disminución del 28% en la sobrevida total, un aumento de eventos trombóticos profundos, además de una asociación significativa entre la recurrencia y la muerte debida a la enfermedad, en el grupo de pacientes tratados con Epo. Por el contrario, los estudios realizados por Blohmer JU et al., (2004), Strauss HG et al., (2008), y Gupta S et al., (2009) en CaCu; reportan que Epo no afecta la sobrevida de las pacientes. El trabajo realizado por Blohmer JU y colaboradores, es el estudio con mayor número pacientes de CaCu, con un total de 229 pacientes, sus resultados reportan que el tratamiento con Epo está asociado de manera significativa a un aumento en la sobrevida libre de recurrencia, y no observaron diferencias significativas en la sobrevida total. Ésto es apoyado por el estudio de Strauss HG y colaboradores, que incluyó 74 pacientes: 40 en el grupo control y 34 en el grupo tratado con Epo, pues tampoco hallaron diferencias significativas en la presencia de eventos trombóticos, ni en la sobrevida total o libre de recurrencia. Finalmente el trabajo de Gupta S y colaboradores, que incluyó 155 pacientes: 57 en el grupo tratado con tratado Epo y 58 en el grupo control, reportó que en el grupo que recibió Epo hubo una disminución en la necesidad de transfusiones y un incremento en la calidad de vida de los pacientes,

además no se observó relación alguna entre la administración de Epo y la aparición de eventos tromboticos o diferencias significativas en la sobrevida total.

III. ANTECEDENTES.

Dado el gran número de interrogantes acerca del uso de la Epo para corregir la anemia en pacientes con CaCu, en nuestro laboratorio se han realizado una serie de estudios que demuestran que líneas celulares de CaCu expresan el EpoR de manera constitutiva (López Pérez V, observación no publicada) y que la administración de Epo protege a dichas células contra la muerte inducida por cisplatino, pero no contra la muerte inducida por doxorubicina. Estas observaciones han sido reproducidas *in vivo* en un modelo murino (Vázquez Mellado-Petit MJ. 2009).

IV. JUSTIFICACIÓN.

El CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres en nuestro país; dentro de esta población un 30% presenta anemia al iniciar el tratamiento (Candelaria M et al., 2005), condición que ha sido asociada a un pobre pronóstico (Caro et al., 2001) por lo cual es importante corregirla. En México la principal alternativa para tratar la anemia en pacientes con cáncer es el uso de la Epo humana recombinante (López et al., 2008; IMSS). Sin embargo, observaciones previas en nuestro laboratorio demuestran que la Epo es capaz de proteger a las células tumorales de CaCu de la muerte inducida por Cisplatino. Por tanto, es importante evaluar el efecto de la Epo sobre la amplia gama de quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu; y así determinar si existe un efecto protector diferencial sobre el grupo de quimiofármacos empleados para tratar el CaCu.

V. HIPÓTESIS.

La eritropoyetina humana recombinante ejerce un efecto diferencial sobre la muerte de células de CaCu, inducida por los quimiofármacos empleados en el tratamiento de este tipo de cáncer.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si la Epo ejerce un efecto protector diferencial en la línea celular HeLa sobre la muerte celular inducida por los quimiofármacos que forman parte de los esquemas de tratamiento del CaCu los cuales son: Doxorrubicina, Daunorrubicina, Carboplatino, Oxaliplatino, 5-Fluoroacil, Metotrexato, Vinblastina e Ifosfamida.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el efecto de la Epo, empleando diferentes dosis de la hormona en presencia de la DL_{50} de los quimiofármacos: Doxorrubicina, Daunorrubicina, Carboplatino, Oxaliplatino, 5-Fluoroacil, Metotrexato, Vinblastina e Ifosfamida.
- Determinar la actividad enzimática de las caspasas iniciadoras y efectoras, para las combinaciones de quimiofármacos y Epo, en los que observemos un efecto.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Material biológico, quimiofármacos y eritropoyetina.

Durante todo el trabajo se empleó la línea celular HeLa (que tiene integrado el genoma del VPH 18) derivada de un carcinoma cervical. Los quimiofármacos Daunorrubicina, Carboplatino, Oxaliplatino, 5-Fluouracilo y la Eritropoyetina Humana Recombínante fueron comprados a los laboratorios farmacéuticos PiSA, la Doxorubicina fue manufacturada por Genéricos Intercambiables, el Metotrexato y la Vinblastina fueron comprados a Sigma Aldrich.

7.2 Cultivo celular.

Las células se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) GIBCO suplementado con: 2% de suero fetal bovino GIBCO inactivado (apéndice I), 0.5% de antibiótico penicilina-estreptomicina (10 000 U de penicilina, 10 000 µg de estreptomicina Invitrogen) y en incubación a 37°C y a 5% de CO₂.

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

7.3 Ensayo de MTT.

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983, siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. El ensayo de MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), se basa en una reacción realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que transforma el MTT en un compuesto color azul

(formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es empleado para medir de manera indirecta la sobrevivencia y proliferación celular, pues se considera que la cantidad de células vivas es proporcional a densidad óptica producida por los cristales de formazán.

Para realizar el ensayo de MTT (posterior al tratamiento que se desee evaluar) se retiró el medio de las células y se agregaron 100 μL medio nuevo a 37°C y 50 μL de MTT (apéndice IV), posteriormente las células se incubaron durante 2 h a 37°, pasado este tiempo se retiró cuidadosamente el medio con MTT; y los cristales formados por la reacción de óxido-reducción se disolvieron en 100 μL de isopropanol, finalmente esta solución de los cristales fue transferida a una placa de 96 pozos nueva, para leer las absorbancias a 570 nm en un lector de placas (Bio-Tek, ELx-800).

7.4 Determinación de la DL_{50} de los quimiofármacos.

Para la determinación de la DL_{50} se sembraron 50 000 células/ 200 μL DMEM en placas de 96 pozos, se permitió que las células se adhirieran incubando por 2 h, transcurrido ese tiempo se agregaron concentraciones crecientes de los fármacos empleados. Todos los quimiofármacos fueron disueltos en DMEM (GIBCO suplementado con 2% de suero fetal bovino GIBCO inactivado y al 0.5% de antibiótico, penicilina-estreptomicina) a excepción del 5-Fluorouracilo cuya presentación es líquida, una vez administrado el quimiofármaco, las células se incubaron nuevamente durante 24 h. Posterior a esto se realizó un ensayo de MTT y la solución de los cristales de formazan en isopropanol, fue transferida a una placa de 96 pozos limpia, para leerse a 570 nm en un lector de placas (Bio-Tek, ELx-800).

7.5 Ensayos para determinar el efecto de Epo sobre la muerte inducida por quimiofármacos.

Para los ensayos con Epo (Exetin-A, solución inyectable PiSA), fueron sembradas 50 000 células/ 100 μ L de DMEM en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C por 2 h para permitir que se adhirieran a las placa. Pasado este tiempo se agregaron concentraciones crecientes de Epo en un rango de 1 U/mL - 100 U/mL, las células fueron incubadas nuevamente por 2 h, y posteriormente se agregó la DL₅₀ del quimiofármaco a analizar, cada pozo fue llevado a un volumen final de 200 μ L y las células fueron incubadas durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizó un ensayo de MTT y la solución de los cristales de formazan en isopropanol, fue transferida a una placa de 96 pozos limpia, para leerse a 570 nm en un lector de placas (Bio-Tek, ELx-800).

7.6 Determinación de la actividad de caspasas.

Para determinar la actividad de caspasas se utilizó el kit de BioVision Caspase-Family Colorimetric Substrate Set II Plus (Cat. K-138-9-25) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron 4×10^6 células en cajas de cultivo y se incubaron por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el medio y las células fueron lavadas dos veces con PBS a 4°C, y se procedió a administrar los diferentes tratamientos: 1) Células sin Epo y sin quimiofármaco, 2) Células con DL₅₀ del quimiofármaco y 3) Células con 100 U/mL de Epo y DL₅₀ del quimiofármaco. Transcurrido el tiempo de los tratamientos, se retiró el medio, se lavó 2 veces con PBS y se agregaron 2 mL de verseno a 37°C, se incubó por 5 min 37°C y las células fueron desprendidas y centrifugadas a 5000 rpm por 5 min; se retiró el sobrenadante y se agregaron 50 μ L de búfer de lisis (BioVision CA) por cada 4×10^6 células sembradas; las células fueron resuspendidas y lisadas con una jeringa para insulina de 1 mL, posteriormente se incubaron por 10 min en hielo y el lisado fue centrifugado a 12 500 rpm por 1 min, se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo de 1.5 mL nuevo que se mantuvo en hielo.

Una vez extraída la proteína, ésta fue cuantificada con el kit Bio Rad-DC Protein Assay (basado en el método de Lowry, que detecta principalmente aminoácidos como tirosina, triptófano, y en menor cantidad a la cistina, cisteína y la histidina). Posteriormente, se tomaron alícuotas de la proteína extraída para guardarlas a -80°C en un ultracongelador Sanyo, otra fracción de la proteína fue utilizada para determinar actividad de caspasas.

Para los ensayos de actividad de caspasas, se adicionaron $150\ \mu\text{g}$ de proteína y se llevó a un volumen de $50\ \mu\text{L}$ con el búfer de lisis (Bio Vision) acorde a la concentración del extracto, posteriormente se añadieron $50\ \mu\text{L}$ del búfer 2X 10mM DTT (el cual debe ser preparado justo antes de realizar el ensayo) y se agregaron $5\ \mu\text{L}$ del sustrato correspondiente a la caspasa a determinar; se incubó por 2 h a 37°C y transcurrido éste tiempo, se determinó la densidad óptica a 405 nm en un lector de placas (Bio-Tek, ELx-800), siendo la densidad óptica directamente proporcional a la actividad enzimática de la caspasa en la muestra analizada.

7.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico para la regresión lineal fue realizado con el programa Excell 2007 (Microsoft) . Para analizar el efecto de la Epo sobre la muerte celular inducida por quimiofármacos, se empleó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0., los resultados fueron analizados con una ANOVA seguida de la prueba de Tukey, a una significancia de $P < 0.05$. En los ensayos de actividad de caspasas se empleó una prueba T, considerando un dato como significativo si la $P < 0.05$. Los resultados representan la media \pm una desviación estándar.

VIII. RESULTADOS.

8.1 Determinación de las dosis letales cincuenta (DL₅₀).

Para determinar las DL₅₀ de los quimiofármacos, se realizó una curva estándar que nos permitió establecer una relación entre la absorbancia y el número de células. Para ello, se sembraron células en un rango de 3906 a 500 000 y se realizó un ensayo de MTT, este procedimiento se hizo por triplicado, en 3 ocasiones diferentes.

Las absorbancias obtenidas se graficaron y se hizo una regresión lineal, de la cual se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 2 \times 10^{-6} + 0.1779$, ésta fue empleada a lo largo de todo el trabajo para realizar la conversión de las absorbancias a número de células.

Posteriormente, se sembraron 50 000 células, las cuales fueron expuestas a dosis graduales de los diferentes quimiofármacos, de acuerdo a lo reportado en la literatura. Para determinar la dosis a la cual moría el 50% de la población, se realizó un ensayo de MTT, las absorbancias obtenidas fueron transformadas a número de células empleando la ecuación ya mencionada, y el número de células fue convertido a porcentaje, considerando el pozo control (no recibió quimiofármaco) como 100%. Las DL₅₀ obtenidas se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. DL₅₀ de los diferentes quimiofármacos. Se sembraron 50 000 células, que fueron tratadas con dosis graduales de los quimiofármacos, las absorbancias obtenidas se convirtieron a número de células con la ecuación de la curva estándar, a su vez el número de células fue convertido a porcentajes, considerando el control como 100%.

Quimiofármaco	DL ₅₀ µg/mL
Vinblastina	0.04
Metotrexato	0.1
Doxorubicina	0.7
Daunorubicina	2.0
Oxaliplatino	132.5
Carboplatino	250.0
5-Fluorouracilo	437.5
Ifosfamida	3000

8.2 Determinación del efecto de la Epo humana recombinante, sobre la muerte inducida por los quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu.

La línea celular HeLa fue tratada con las siguientes dosis de Epo: 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 U/mL y la DL₅₀ de los diferentes quimiofármacos. De acuerdo a observaciones previas en nuestro laboratorio, la Epo ejerce un efecto diferencial, pues protege a la línea celular HeLa de la muerte inducida por cisplatino, paclitaxel y tamoxifen; mientras que cuando las células son expuestas a Epo y doxorubicina, se observa un aumento de la muerte celular (Vázquez-Mellado Petit MJ, 2009). Dado que los mecanismos de muerte activados por doxorubicina y daunorrubicina son muy similares, decidimos incluir a la daunorrubicina en nuestro análisis, a pesar de que no es empleada en el tratamiento del CaCu.

Durante este trabajo observamos que la Epo tiene diferentes efectos sobre la muerte inducida por los quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu. En el caso de doxorubicina y daunorrubicina, la Epo exacerba el efecto citotóxico de ambos antineoplásicos; esto puede observarse a 30, 40 y 100 U/ml de Epo para la doxorubicina (Figura 4A) y a 100 U/mL para la daunorrubicina (Figura 4B). La Epo incrementa hasta en un 21% el efecto citotóxico de doxorubicina y hasta un 28% la citotoxicidad de la daunorrubicina. En los ensayos realizados con las diferentes dosis de Epo y las DL₅₀ de metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, ifosfamida, carboplatino y oxaliplatino; no observamos ningún efecto sobre la muerte celular (Figuras 5, 6 y 7).

Las observaciones anteriores indican que Epo potencia el efecto citotóxico de doxorubicina y daunorrubicina, y no afecta la muerte inducida por metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, ifosfamida, carboplatino y oxaliplatino.

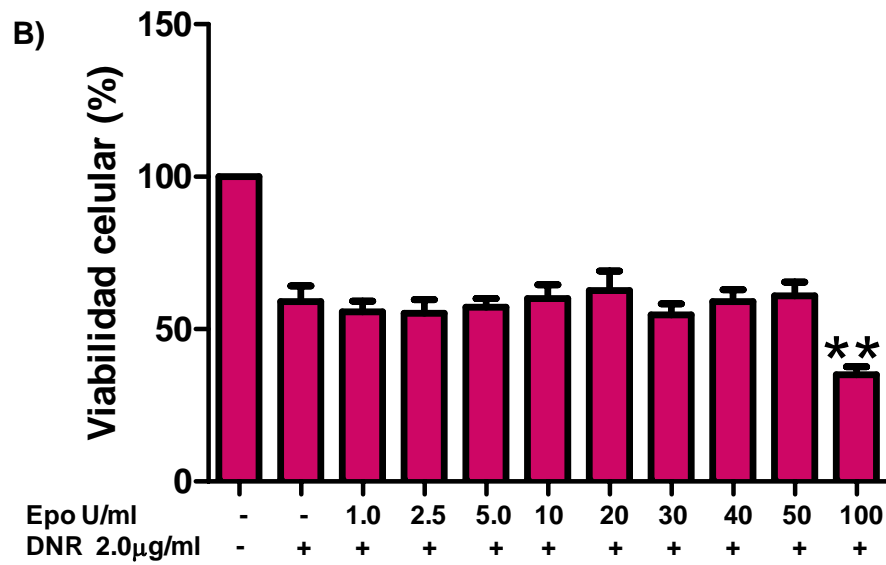
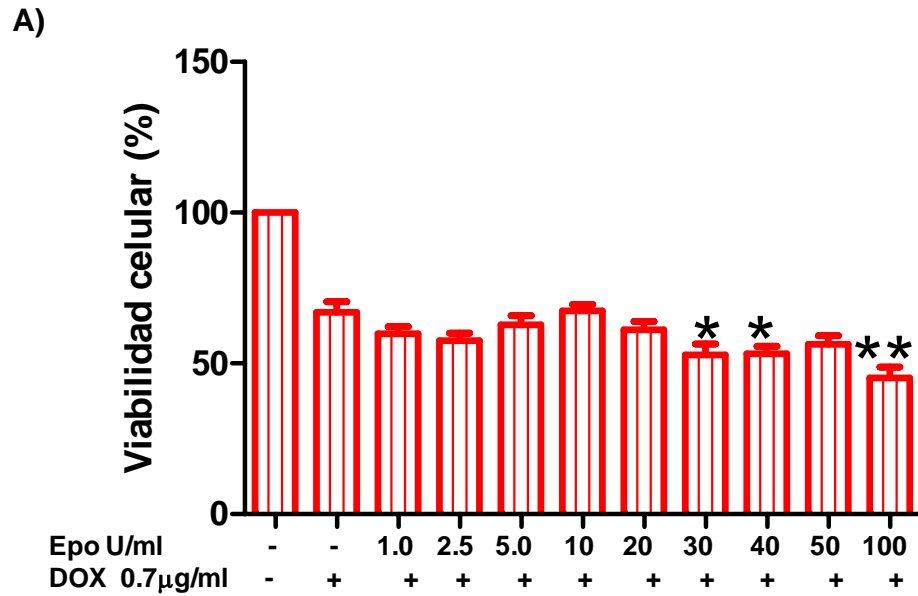


Figura 4. Efecto de la Epo sobre la muerte inducida por Doxorubicina (DOX) y Daunorrubicina (DNR).

Se sembraron 5×10^4 células HeLa, las cuales fueron incubadas durante 2h con las concentraciones indicadas de Epo, posteriormente se adicionó la DL_{50} de A) DOX y B) DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo de MTT, el cual fue leído a 570 nm. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado, con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$. ** $P < 0.0001$

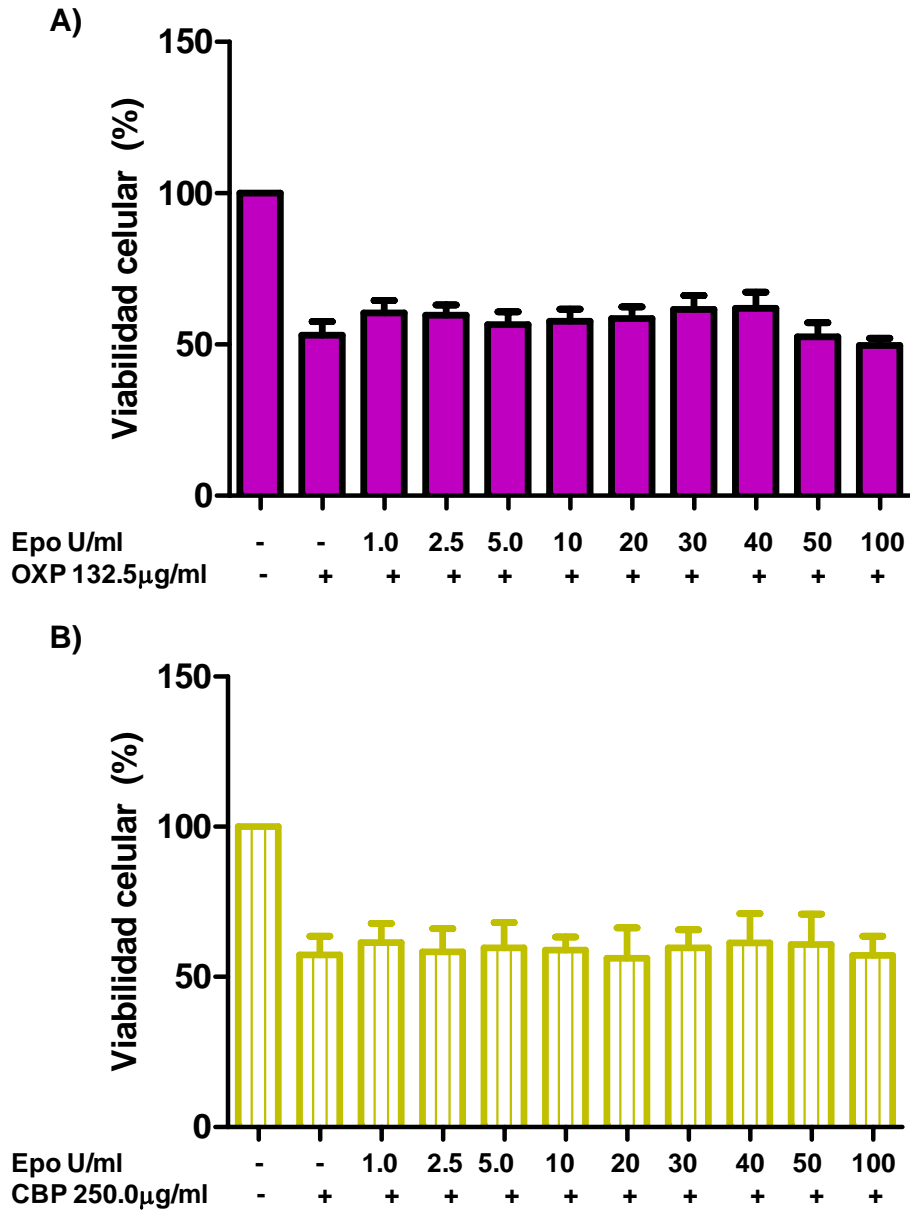


Figura 5. Efecto de la Epo sobre la muerte inducida por Oxaliplatino (OXP) y Carboplatino (CBP).

Se sembraron 5×10^4 células HeLa, las cuales fueron incubadas durante 2h con las concentraciones indicadas de Epo, posteriormente se adicionó la DL_{50} de A) OXP y B)CBP. Transcurridas 24h se realizó un ensayo de MTT, el cual fue leído a 570 nm. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

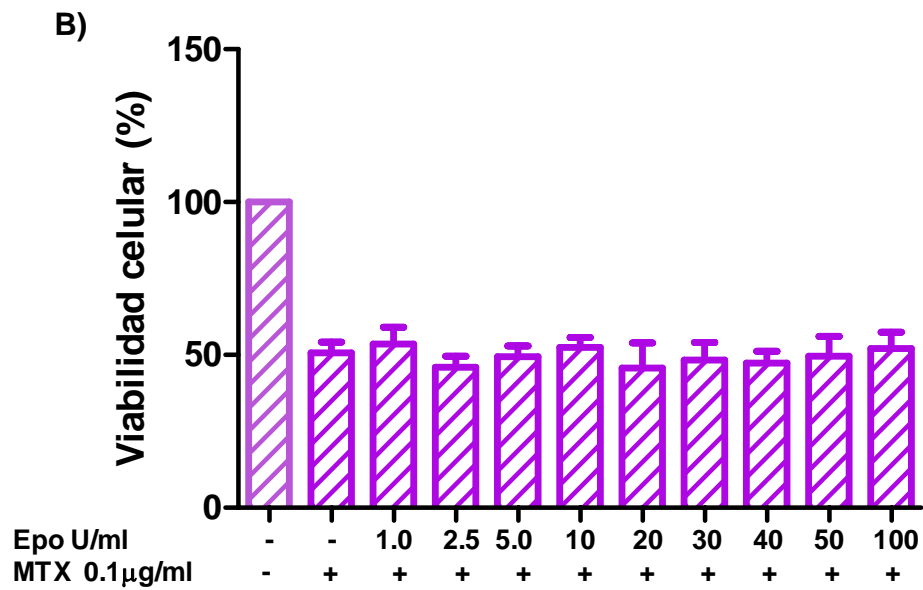
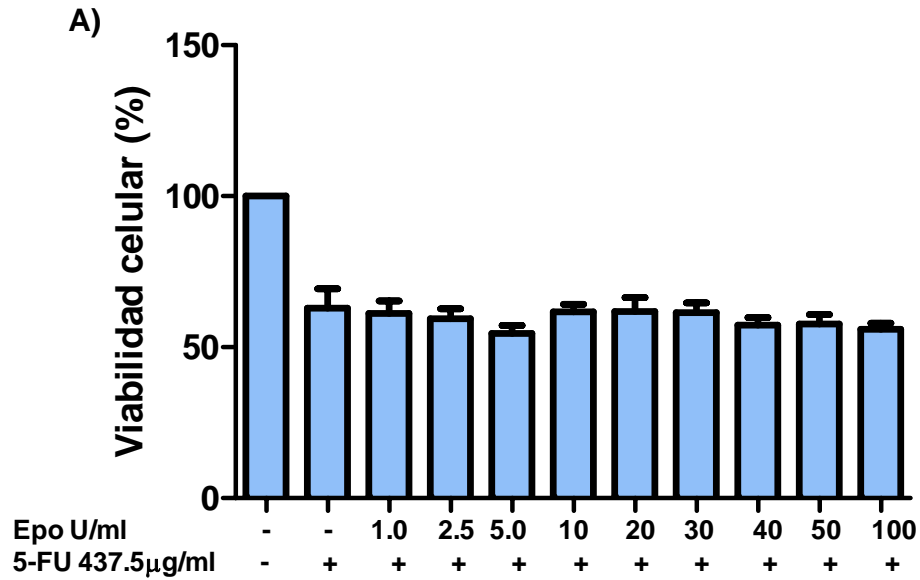


Figura 6. Efecto de la Epo sobre la muerte inducida por 5-Fluorouracilo (5-FU) y Metotrexato (MTX).

Se sembraron 5×10^4 células HeLa, las cuales fueron incubadas durante 2h con las concentraciones indicadas de Epo, posteriormente se adicionó la DL_{50} de A) 5-FU y B) MTX. Transcurridas 24h se realizó un ensayo de MTT, el cual fue leído a 570 nm. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

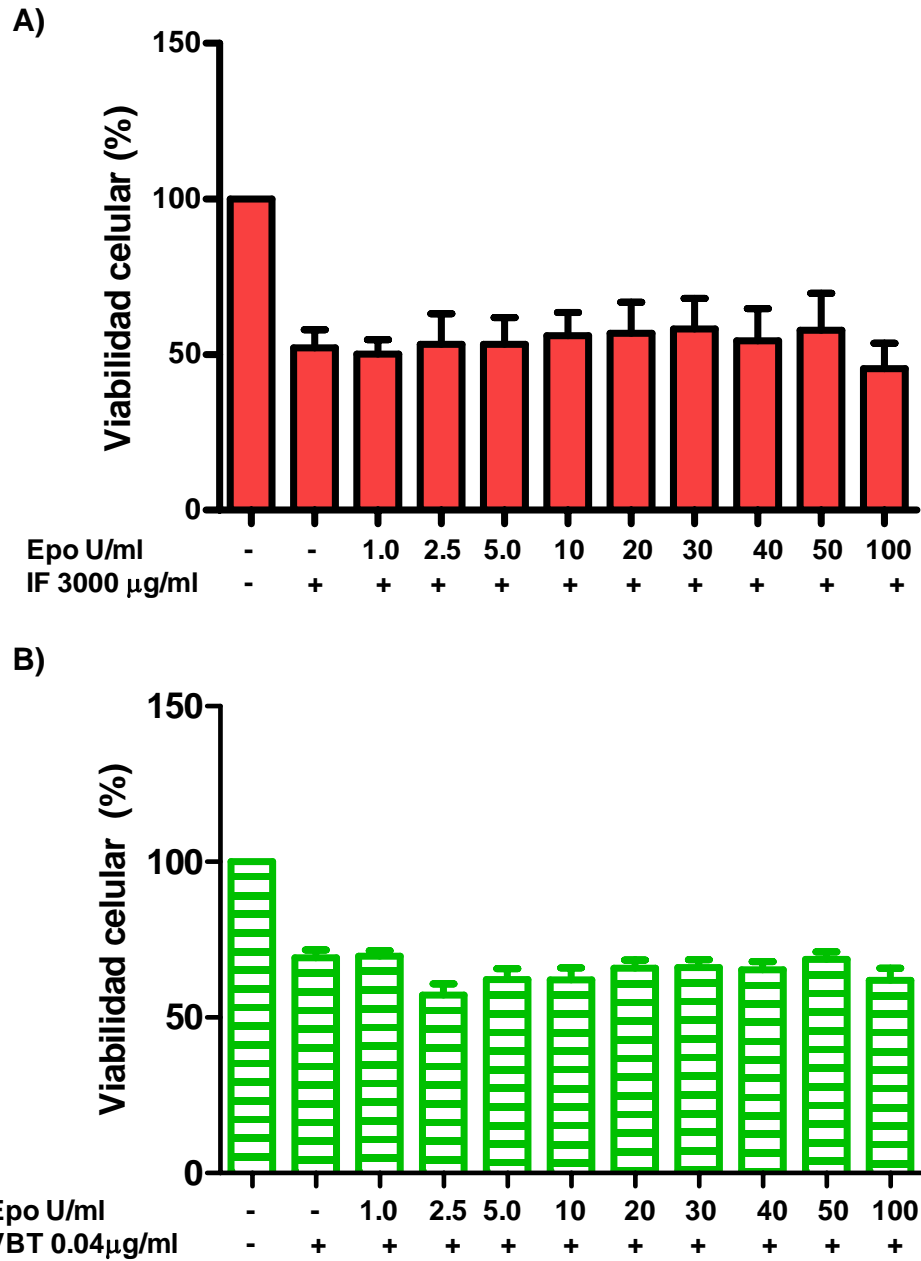


Figura 7. Efecto de la Epo sobre la muerte inducida por Ifosfamida (IF) y Vinblastina (VBT).

Se sembraron 5×10^4 células HeLa, las cuales fueron incubadas durante 2h con las concentraciones indicadas de Epo, posteriormente se adicionó la DL_{50} de A) IF y B) VBT. Transcurridas 24h se realizó un ensayo de MTT, el cual fue leído a 570 nm. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

8.3 Determinación de la actividad enzimática de caspasa-3.

Nuestras observaciones indican que la Epo incrementa la citotoxicidad de daunorrubicina y doxorrubicina (Figura 4). Reportes previos señalan que ambas antraciclinas inducen muerte celular por apoptosis (Gewirtz D. 1999), y un estudio realizado por Carvalho G et al., (2005) donde se reporta que Epo quimiosensibiliza a células de carcinoma renal y leucemia, a daunorrubicina y vinblastina; se observó que Epo aumenta el número de células que mueren por apoptosis. En base a estos antecedentes, decidimos investigar si la Epo incrementa este tipo de muerte celular y por medio de ello la citotoxicidad de doxorrubicina y daunorrubicina. Para ello empleamos a la caspasa-3 como marcador de apoptosis; realizando ensayos colorimétricos de la actividad de esta enzima, en células de CaCu tratadas con daunorrubicina y doxorrubicina en presencia y ausencia de 100 U/mL de Epo.

Nuestros resultados, muestran que la doxorrubicina y daunorrubicina inducen la activación de la caspasa-3 (Figura 8); aunque doxorrubicina es capaz de inducir una mayor activación de ésta enzima. Lo anterior demuestra que ambos antineoplásicos son capaces de activar a la principal caspasa efectora de las vías intrínseca y extrínseca.

De manera interesante, la administración de Epo no indujo un incremento en la actividad de la caspasa-3, lo que indica que el mecanismo por el cual Epo incrementa la citotoxicidad de las antraciclinas no es mediado por esta enzima. Sin embargo, durante el proceso de apoptosis se activa un amplio espectro de caspasas; además se ha observado que durante la diferenciación de los progenitores eritroides, la Epo es capaz de inducir la activación transitoria de las caspasas-2, -7 y -9 (Droin N et al., 2008). Por lo que decidimos realizar ensayos de actividad para el resto de caspasas, tanto iniciadoras como efectoras, en presencia y ausencia de Epo; para determinar si la Epo era capaz de incrementar la actividad de alguna de estas enzimas.

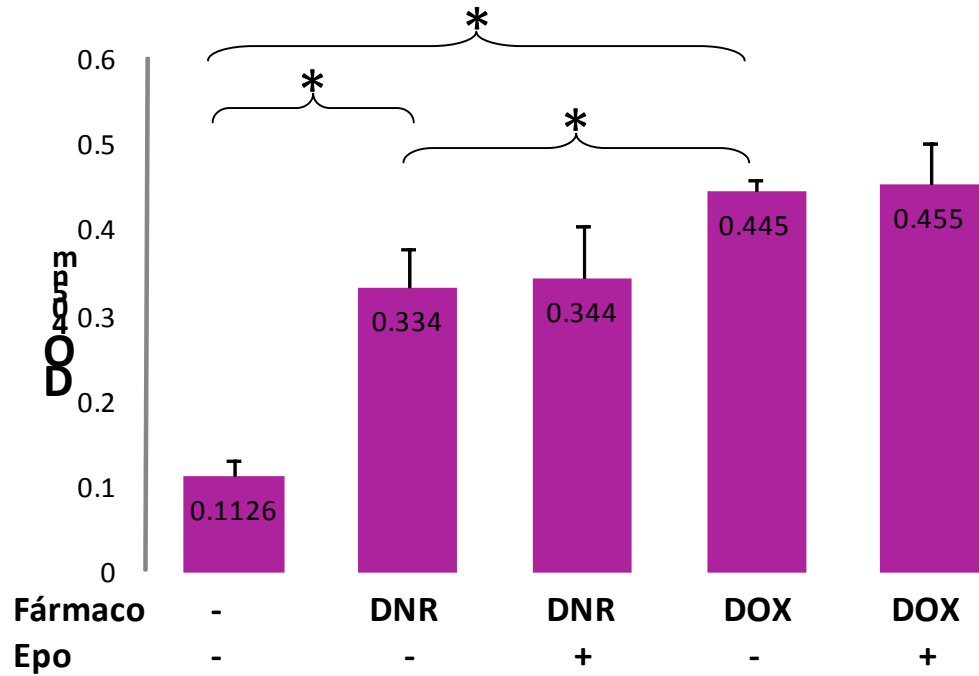


Figura 8. Efecto de la EPO sobre la actividad de caspasa-3 inducida por Daunorubicina (DNR) y Doxorubicina (DOX). Se sembraron 4×10^6 células y se incubaron por 24h. Acorde a lo que se indica, dos grupos fueron pretratados con 100 U/mL de Epo, 2h después se adicionó la DL_{50} de DOX o DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo colorimétrico de actividad de la caspasa-3. En cada barra, se indica el promedio en el extremo superior, cada uno con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$.

8.4 Determinación de la actividad enzimática de caspasas iniciadoras y efectoras.

Dado que la Epo no afecta la actividad de caspasa-3, decidimos determinar la actividad enzimática del resto de enzimas pertenecientes a esta familia. Para determinar la actividad de caspasas utilizamos el kit Caspase-Family Colorimetric Substrate.

Los resultados se muestran en las figuras 9 a 12. Como se observa en la figura 9A, ambos quimiofármacos son capaces de inducir la activación de caspasa-1 de manera significativa, sin embargo, doxorubicina induce una mayor actividad de esta enzima, comparada con daunorrubicina; y Epo induce un ligero, aunque significativo, incremento en la actividad de caspasa-1 inducida por los dos antineoplásicos. Por otra parte en el gráfico de la caspasa-2 (Figura 9-B), ambas antraciclinas inducen un incremento significativo en su actividad, y de nuevo la doxorubicina indujo una mayor actividad de ésta enzima, en este caso la Epo no afectó la actividad de esta caspasa.

En los ensayos de actividad de caspasa-4 (Figura 10A) sólo doxorubicina fue capaz de inducir un incremento significativo en la actividad de esta enzima, y la Epo no tuvo efecto alguno. Para la caspasa-5 (Figura 10B) ni los quimiofármacos ni la Epo indujeron un incremento en su actividad.

En el caso de la caspasa-6 (Figura 11A) ambas, doxorubicina y daunorrubicina, indujeron un incremento en su actividad, pero nuevamente observamos la tendencia de doxorubicina a inducir una mayor actividad respecto de daunorrubicina, por otra parte la Epo no influyó en la actividad de esta caspasa. En los ensayos de actividad de caspasa-8 (Figura 11B), observamos que las dos antraciclinas inducen un incremento similar en su actividad, y sorprendentemente la Epo disminuyó la actividad de caspasa-8 inducida por daunorrubicina, este fenómeno no se reprodujo para doxorubicina, lo que sugiere una diferencia en los mecanismos de inducción y regulación de los quimiofármacos, a nivel de esta caspasa iniciadora de la vía extrínseca.

Finalmente en los ensayos de la caspasa-9 y caspasa-10 (Figura 12A y 12B). Ambas caspasas fueron inducidas por daunorrubicina y doxorubicina a niveles similares, y al igual que en la caspasa-8, la Epo disminuyó la actividad de caspasa-9 y caspasa-10 inducidas por daunorrubicina, lo cual no se observó en el caso de la doxorubicina.

En conjunto estas observaciones evidencian la existencia de diferencias en los mecanismos de daunorrubicina y doxorubicina, a nivel de estas tres caspasas. Por otra parte, el hecho de que la Epo disminuya la actividad de estas tres enzimas, sugiere que el mecanismo por el cual Epo incrementa la citotoxicidad de daunorrubicina y doxorubicina es independiente de caspasas. Lo cual no implica que la Epo no sea capaz de incrementar el número de células que mueren por apoptosis; por lo que la comprensión del mecanismo por el cual Epo sinergiza con las antraciclinas requiere de más estudios y ensayos cuantitativos que nos permitan establecer si existe un incremento de células que mueren por apoptosis o por otro tipo de muerte celular.

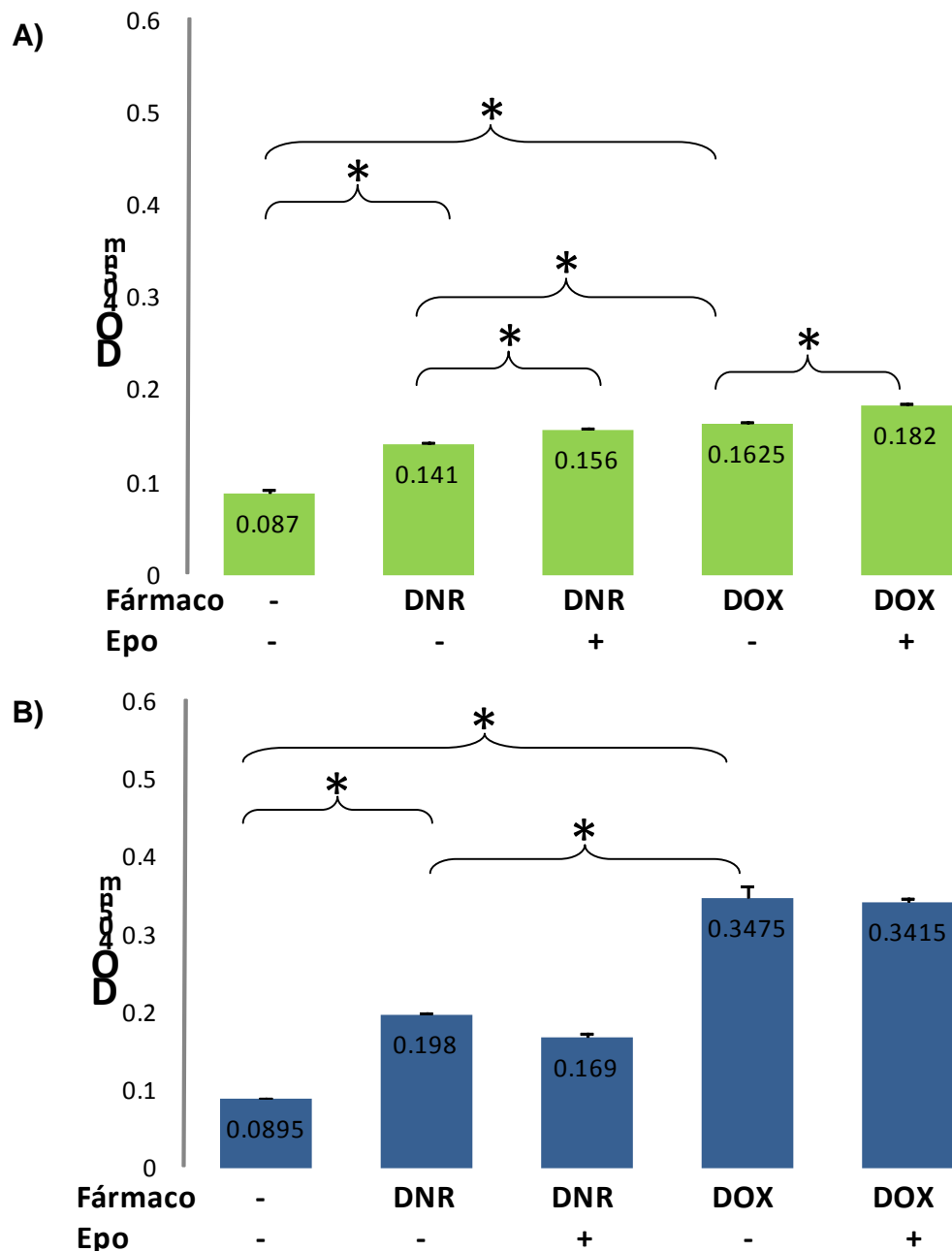


Figura 9. Efecto de la EPO sobre la actividad de caspasa-1 y caspasa-2 inducidas por Daunorrubicina (DNR) y Doxorubicina (DOX). Se sembraron 4×10^6 células y se incubaron por 24h. Acorde a lo que se indica, dos grupos fueron pretratados con 100 U/mL de Epo, 2h después se adicionó la DL_{50} de DOX o DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo colorimétrico de actividad de A) caspasa-1 y B) caspasa-2. En cada barra, se indica el promedio en el extremo superior, cada uno con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$.

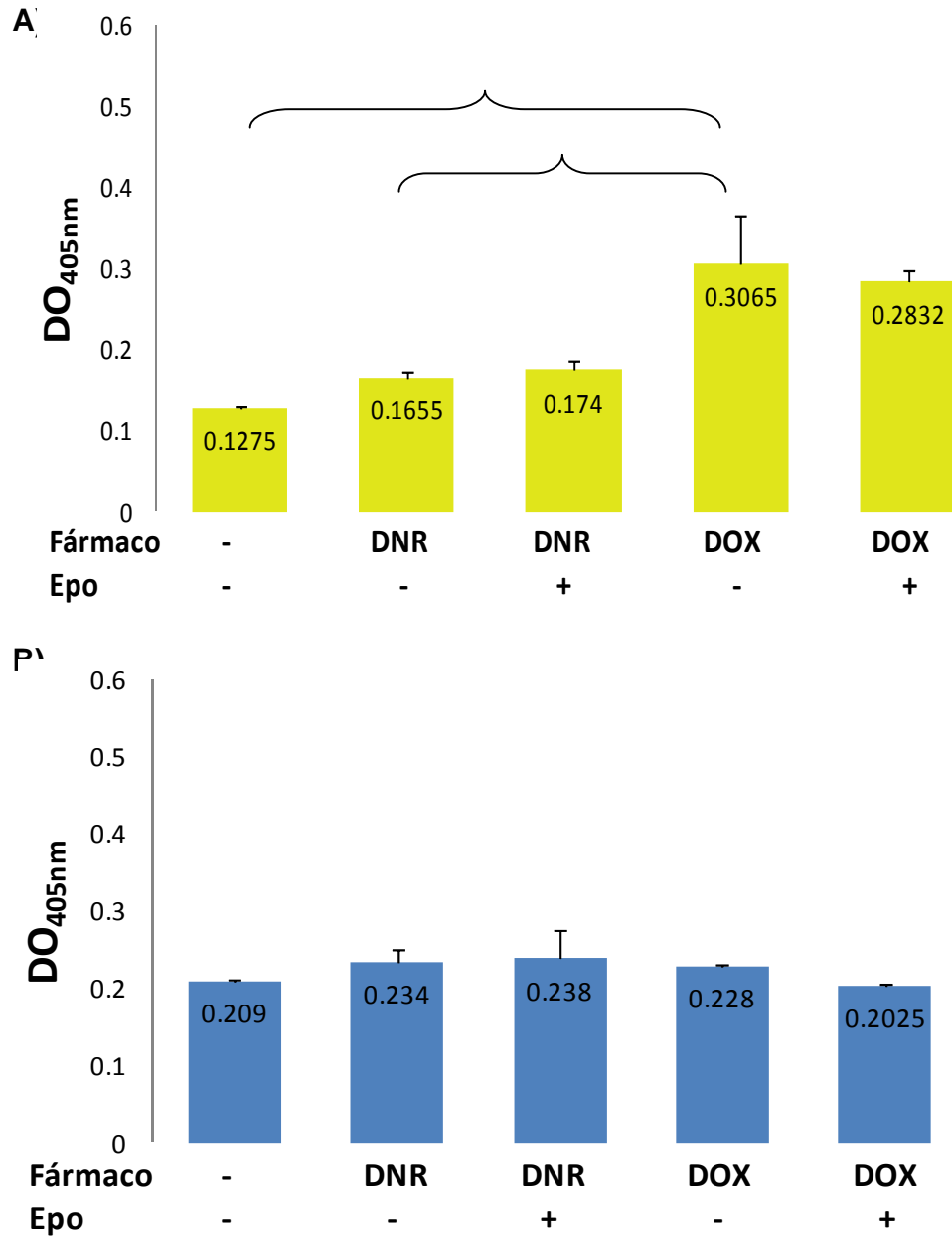


Figura 10. Efecto de la EPO sobre la actividad de caspasa-4 y caspasa-5 inducidas por Daunorrubicina (DNR) y Doxorubicina (DOX). Se sembraron 4×10^6 células y se incubaron por 24h. Acorde a lo que se indica, dos grupos fueron pretratados con 100 U/mL de Epo, 2h después se adicionó la DL_{50} de DOX o DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo colorimétrico de actividad de A) caspasa-4 y B) caspasa-5. En cada barra, se indica el promedio en el extremo superior, cada uno con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$.

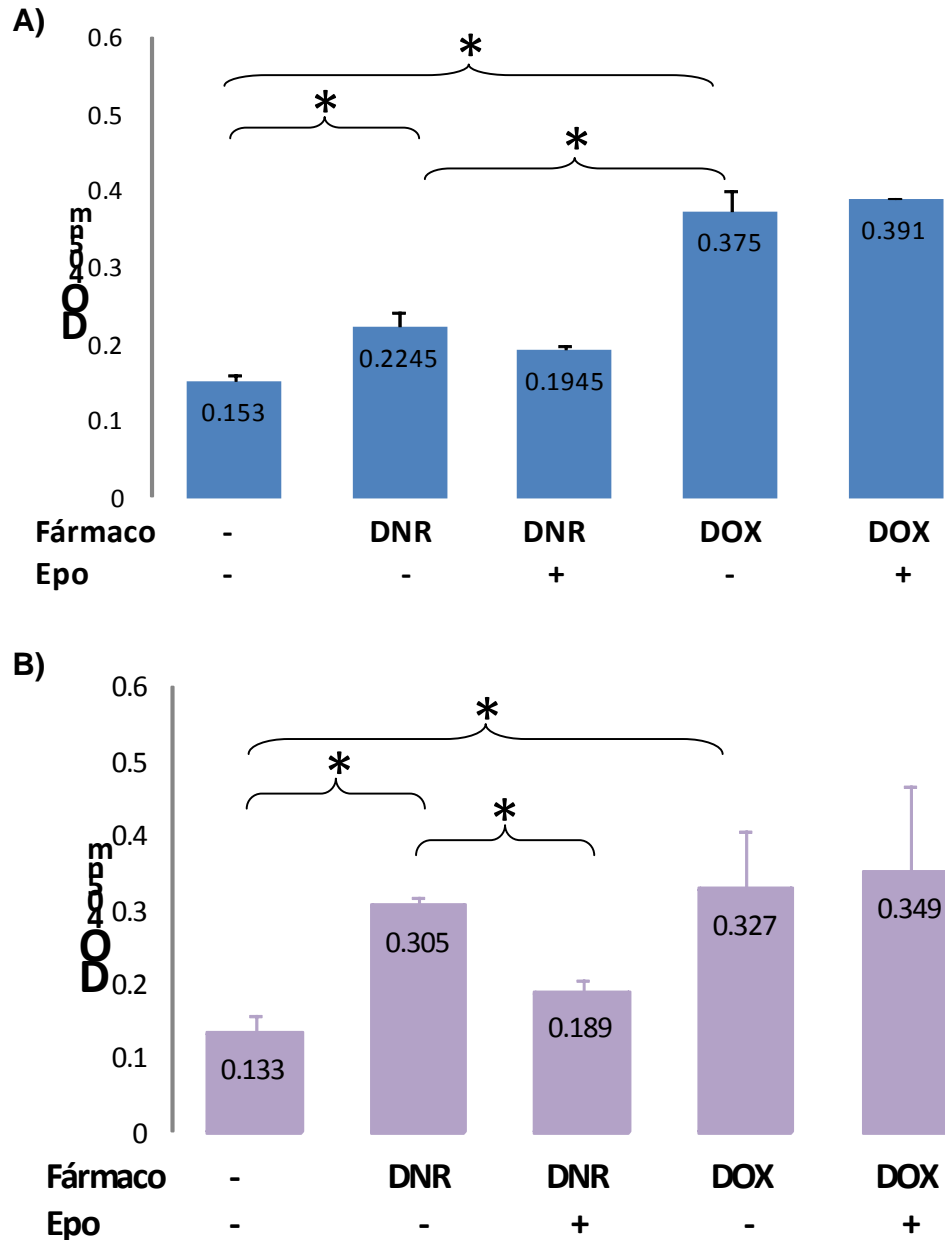


Figura 11. Efecto de la EPO sobre la actividad de caspasa-6 y caspasa-8 inducidas por Daunorrubicina (DNR) y Doxorubicina (DOX). Se sembraron 4×10^6 células y se incubaron por 24h. Acorde a lo que se indica, dos grupos fueron pretratados con 100 U/mL de Epo, 2h después se adicionó la DL_{50} de DOX o DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo colorimétrico de actividad de A) caspasa-6 y B) caspasa-8. En cada barra, se indica el promedio en el extremo superior, cada uno con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$.

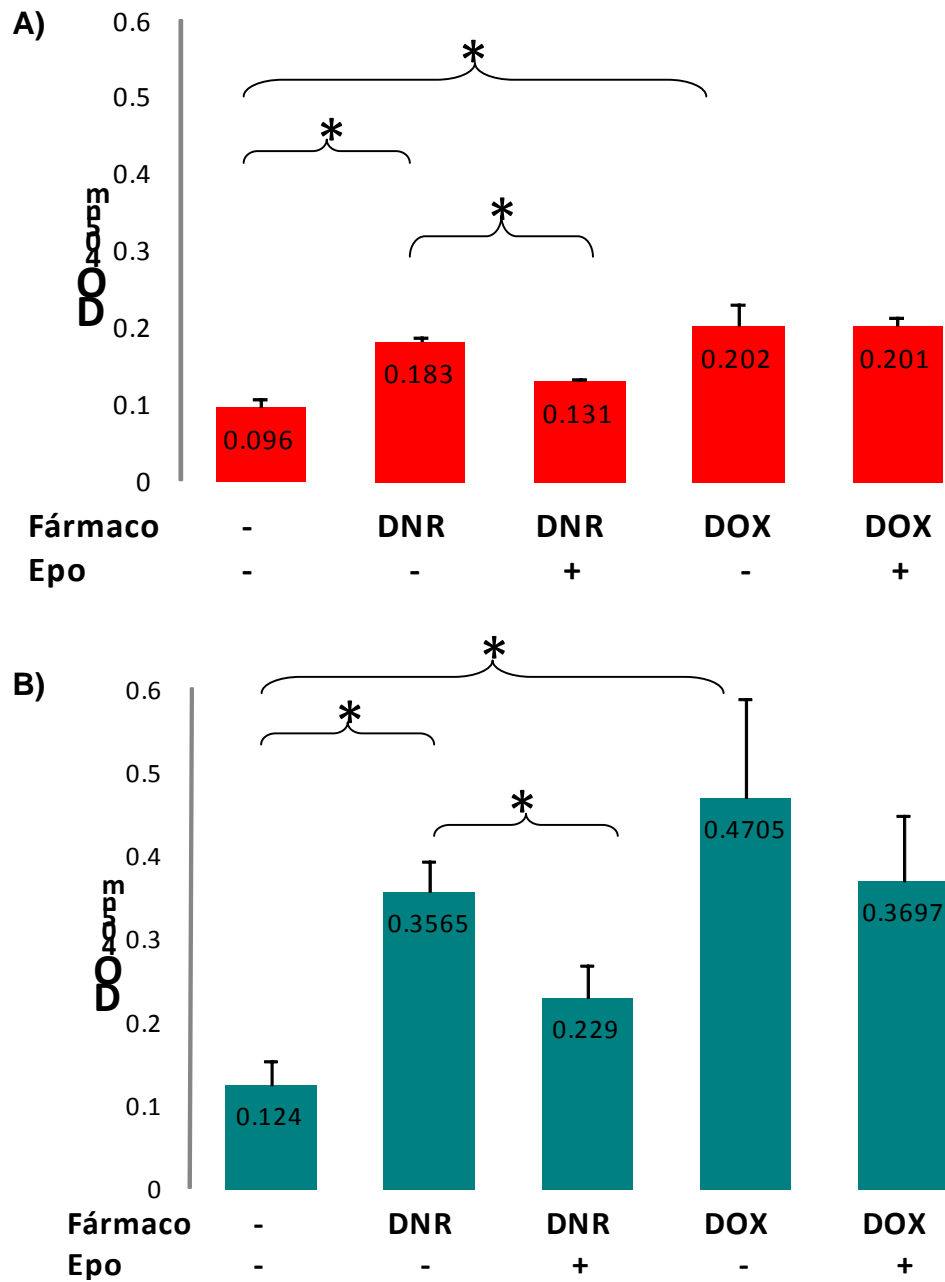


Figura 12. Efecto de la EPO sobre la actividad de caspasa-9 y caspasa-10 inducidas por Daunorrubicina (DNR) y Doxorrubicina (DOX). Se sembraron 4×10^6 células y se incubaron por 24h. Acorde a lo que se indica, dos grupos fueron pretratados con 100 U/mL de Epo, 2h después se adicionó la DL50 de DOX o DNR. Transcurridas 24h se realizó un ensayo colorimétrico de actividad de A) caspasa-9 B) caspasa-10. En cada barra, se indica el promedio en el extremo superior, cada uno con su respectiva desviación estándar. * $P < 0.05$.

IX. DISCUSIÓN.

El tratamiento del CaCu incluye diferentes estrategias que son aplicadas de acuerdo al estadio del tumor. La quimioterapia suele ser empleada como terapia adyuvante en estadios avanzados, en combinación con radioterapia. El quimiofármaco estándar para tratar el CaCu es el cisplatino, no obstante el grupo de quimiofármacos para tratar este tipo de cáncer es bastante amplio. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que tumores de CaCu expresan el EpoR (Lopez-Pérez V. observación no publicada) y que la Epo exógena es capaz de ejercer un efecto protector diferencial, pues cuando su uso se combina con cisplatino protege a las células de CaCu de la muerte inducida por este quimiofármaco, lo cual no sucede con la doxorubicina (Vázquez Mellado-Petit MJ 2009).

Dado que la Epo exógena ejerce un efecto diferencial que varía de acuerdo al antineoplásico con que se combine, en este trabajo decidimos analizar el efecto de la Epo sobre 8 diferentes antineoplásicos empleados en el tratamiento de CaCu los cuales son: carboplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, metotrexato, vinblastina, lfosfamida, doxorubicina y daunorrubicina. A pesar de que la daunorrubicina no es empleada para tratar el CaCu, la incluimos por poseer un mecanismo de acción muy similar al de la doxorubicina. Es importante mencionar que este trabajo es el primero que explora el efecto de Epo, sobre un grupo tan amplio de quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu.

Nuestras observaciones muestran que la Epo no protege a la línea celular HeLa de la muerte inducida por: carboplatino, oxaliplatino, vinblastina, 5-fluorouracilo y metotrexato. En cambio observamos que cuando la Epo se combina con las antraciclinas daunorrubicina y doxorubicina, es capaz de incrementar el número de células que mueren por la acción de estos antineoplásicos.

El carboplatino es un quimiofármaco de la familia del cisplatino, y al igual que este antineoplásico induce apoptosis mediante la formación de aductos en la cadena de DNA, uniones

cruzadas en el DNA y proteínas; debido a que los mecanismos de acción del carboplatino y el cisplatino son muy similares, la observación de que Epo no protege a las células de CaCu de la muerte inducida por carboplatino fue un tanto inesperada, pues como ya se mencionó nuestro grupo ha observado que la Epo es capaz de proteger a las células de CaCu de la muerte inducida por cisplatino, además en la clínica se ha reportado que el carboplatino llega a presentar resistencia cruzada con el cisplatino (Di Francesco AM et al., 2002). Sin embargo, nuestra observación concuerda con un estudio *in vitro* realizado por Solar P et al., (2007) quien reporta que la línea celular A780 de cáncer de ovario, cultivada por dos meses en presencia de 5 y 35 U/mL de Epo, presenta resistencia a la muerte inducida por paclitaxel (lo que concuerda con observaciones previas de nuestro laboratorio), pero no a la inducida por carboplatino y cisplatino. Nuestros resultados y los de este grupo confirman que la Epo es capaz de ejercer un efecto protector diferencial que parece depender del linaje celular y del esquema de tratamiento. Otra evidencia que apoya nuestras observaciones, es el hecho de que en la clínica la eritropoyetina ha sido combinada con carboplatino para tratar cáncer de pulmón, y no se han observado efectos adversos (Pirker R et al., 2008).

Hasta donde tenemos conocimiento, éste es el primer trabajo que ha evaluado el efecto de la Epo sobre el oxaliplatino, un derivado más de la familia del cisplatino, el uso en la clínica de este quimiofármaco es relativamente reciente y ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de CaCu recurrente y metastásico (Kuo DY et al., 2010). La Epo tampoco afectó la muerte inducida por oxaliplatino, lo cual puede deberse a que el mecanismo de acción por el cual este quimiofármaco induce muerte celular, difiere del mecanismo de los otros dos miembros de esta familia, cisplatino y carboplatino, pues además de formar aductos en el DNA, se ha propuesto que su principal blanco son los grupos tiol de las proteínas recién sintetizadas (Meynard D et al., 2007).

Acerca del 5-fluorouracilo y el metotrexato, ambos quimiofármacos, pertenecen a la familia de los antimetabólitos, pues interfieren con la síntesis de DNA. En este trabajo observamos que la Epo no protege a la línea celular HeLa de la muerte inducida por estos antineoplásicos, nuestras observaciones son respaldadas por estudios clínicos, en donde se ha reportado que la Epo corrige de manera efectiva y segura la anemia, en pacientes con cáncer tratados con esquemas terapéuticos que incluyen al metotrexato y al 5-fluorouracilo, entre otros fármacos, y excluyen a la quimioterapia basada en derivados de platino (Littlewood TJ et al., 2001). Además, un estudio realizado por Tóvári J et al., (2005) examinó *in vitro* e *in vivo* el efecto de la Epo exógena combinada con 5-fluorouracilo en un carcinoma epidermoide y un carcinoma de colon, ambos expresaban el EpoR. Los resultados del grupo de Tóvári, al igual que los nuestros, demuestran que *in vitro* la Epo no afecta el efecto antiproliferativo del 5-fluorouracilo, en cambio *in vivo* el grupo tratado con 5-fluorouracilo y Epo logró una mayor reducción de la masa tumoral en comparación con el grupo que sólo recibió 5-fluorouracilo. Dado que el efecto *in vitro* difiere del modelo *in vivo*, el grupo de Tóvári sugiere que el efecto quimiosensibilizador observado *in vivo*, no depende del efecto de Epo sobre las células tumorales, más bien es resultado de que la Epo promueve la angiogénesis y con ello incrementa la perfusión de los tumores, y la capacidad del quimiofármaco a acceder a la masa tumoral. A la luz de estas observaciones, resulta interesante y necesario ampliar nuestras observaciones a un modelo *in vivo*, que nos permita determinar si nuestros resultados son reproducibles en ese modelo.

Por otra parte la ausencia de efecto de la Epo sobre la citotoxicidad del metotrexato no tiene antecedentes, pues al parecer nuestro trabajo es el primero en estudiar el efecto *in vitro* de la Epo sobre este antineoplásico. El que la Epo no afecte la actividad de el 5-fluorouracilo y metotrexato, puede deberse a que la Epo se encarga de activar vías que protegen a la célula de la muerte inducida por radicales libres o especies reactivas de oxígeno lo que

se ha observado en cardiocitos (Li Y et al., 2006), o es capaz de activar la vía PI3K/Akt en células derivadas de cáncer de mama (Hardee ME et al., 2006), sin embargo, pareciera que ninguna de estas vías compensa la inhibición que el 5-fluorouracilo ejerce sobre la sintasa de timidato (Yoshioka A et al., 1985; Wataya Y et al., 1989; Oliver FJ et al., 1996) y el bloqueo de la dihidrofolato reductasa provocado por el metotrexato (Jackson RC, Grindey GB. 1984; Fairbanks L et al., 1999), que son enzimas encargadas de sintetizar precursores de las bases nitrogenadas.

En el caso de la ifosfamida, la observación de que la Epo no protege a las células de CaCu de la muerte inducida por este fármaco, concuerda con un estudio *in vivo* en un modelo de cáncer de pulmón, en donde reportan que la Epo muestra una tendencia, aunque ésta no es significativa, a disminuir el peso y volumen de la masa tumoral cuando se combina con ifosfamida (Sigounas G et al., 2004), además en la clínica un estudio que evaluó el impacto de la Epo en pacientes con cáncer de pulmón tratados con ifosfamida y otros antineoplásicos, concluyó que la Epo retrasa la aparición de anemia y reduce la necesidad de transfusiones sanguíneas, sin observar efectos adversos en la sobrevivida de los pacientes (de Campos E et al., 1995).

La vinblastina, fue otro de los fármacos cuya actividad no fue afectada por el pretratamiento con Epo; esta observación difiere de lo reportado por Carvalho G et al., (2005) quienes realizaron un estudio *in vitro* para evaluar el efecto de la Epo sobre células de carcinoma renal y leucemia mielomonocítica, que expresan de manera funcional el EpoR, tratadas con vinblastina, sus resultados demuestran que la Epo es capaz de quimiosensibilizar a las líneas estudiadas contra la muerte inducida por vinblastina, esta quimiosensibilización es mediada por la inhibición que Epo ejerce sobre la vía de rescate de NF- κ B. El trabajo de Carvalho G también estudió el efecto de la daunorrubicina, pues este antineoplásico suele ser empleado en el tratamiento de leucemias; al igual que con la vinblastina, observaron que la Epo quimiosensibiliza a las células contra la daunorrubicina;

este resultado coincide con lo que nosotros observamos en células de CaCu. Pues nuestras observaciones indican que un tratamiento previo de 24h con 100 U/mL de Epo incrementa en un 28% la muerte inducida por daunorubicina. Sin embargo, un estudio *in vitro* realizado en la línea celular de leucemia FMEL, reportó que la Epo no afecta la citotóxicidad de daunorubicina (Gewirtz DA et al., 2006). En conjunto estas observaciones, sugieren que el efecto de Epo varía de acuerdo al fármaco y al linaje celular estudiado, pues en el caso de los trabajos de Carvalho G y Gerwitz DA, a pesar de tratarse de dos neoplasias hematológicas, los efectos son diferentes; aunque resulta interesante el hecho de que en ninguno de los dos casos se observó que la Epo protegiera a estas líneas celulares de la muerte inducida por daunorubicina; pues debido a su origen mieloide se podría haber pensado que la Epo actuaría de acuerdo a su contexto biológico, donde es capaz de proteger a los progenitores eritroides de la muerte por apoptosis (Föller M et al., 2008)

Acerca de la doxorubicina, nuestros resultados indican que la Epo incrementa la muerte inducida por este fármaco en un 21%. Por otra parte un estudio *in vitro* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, concluyó que la Epo no interfiere con los efectos antiproliferativos y citotóxicos de la doxorubicina (Gewirtz DA et al., 2006); lo cual contrasta radicalmente con lo reportado en la clínica por el grupo de Leyland-Jones B, pues sus resultados indicaron que pacientes de cáncer de mama tratadas con antraciclinas y Epo presentan una menor sobrevida en comparación con el grupo que no recibió Epo. Por otra parte, un estudio encaminado a determinar el efecto de la Epo en pacientes bajo quimioterapia que no incluyó derivados de platino, concluyó que la Epo corrige la anemia y mejora la calidad de vida en pacientes de linfoma de no Hodgking y mieloma, tratados con quimioterapia que incluye a la doxorubicina y otros antineoplásicos (Littlewood TJ et al., 2001). Es difícil establecer una conclusión pues en los estudios mencionados la Epo y doxorubicina, se combinan para tratar diferentes tipos de cáncer, por tanto, hasta cierto punto, es comprensible que el efecto de Epo varíe de acuerdo

al linaje celular estudiado. Por otro lado, en la clínica la principal contraindicación para el uso de doxorubicina es la cardiotoxicidad que ésta provoca, pero estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado que la Epo es capaz de proteger a cardiócitos del daño producido por la doxorubicina (Li Longhu et al., 2006; Hamed S et al., 2006), por tanto sería interesante evaluar si el efecto quimiosensibilizador en células de CaCu y cardiprotector de Epo, se conservan en un modelo *in vivo*.

Puesto que la Epo incrementa el efecto citotóxico de la doxorubicina y la daunorubicina, y el estudio de Carvalho G et al., (2005) , reporta que el número de células de carcinoma renal y leucemia que mueren por apoptosis incrementa cuando son tratadas con Epo y daunorubicina; decidimos emplear a la caspasa-3 como marcador de apoptosis, en presencia y en ausencia de Epo, para averiguar si la Epo exacerba la actividad de esta enzima y la muerte por apoptosis. Nuestros resultados, indicaron que ambos antineoplásicos son capaces de inducir la actividad de la caspasa-3, lo que concuerda con observaciones previas de estudios *in vitro* donde se reporta que la doxorubicina es capaz de inducir la activación de esta caspasa de manera dosis dependiente en varias líneas celulares de cáncer gástrico (Seongeun L et al., 2002) y en la línea celular Jurkat (Gamen S et al., 2000); lo mismo se ha observado para daunorubicina en células obtenidas de pacientes con leucemia mielógena aguda (Masquelier M et al., 2004); resulta interesante el hecho de que la doxorubicina indujo una mayor actividad de la caspasa-3, lo que quizá está ligado a una mayor eficiencia para inducir muerte celular. Interesantemente, no observamos ninguna diferencia en la actividad de caspasa-3 en los grupos que fueron pretratados con Epo, este resultado indica que el incremento del efecto citotóxico de daunorubicina y doxorubicina mediado por Epo es independiente de caspasa-3. Sin embargo, lo anterior contrasta con el hecho de que la Epo es capaz de inhibir o promover transitoriamente la actividad de caspasa-3 durante diferentes etapas de la eritropoyesis (Droin N et al., 2008), además

estudios *in vitro* en linajes celulares diferentes como neuronas del hipocampo (Chong Z et al., 2003) y endotelio cerebrovascular (Chong et al., 2003) se ha mostrado que la Epo es capaz de disminuir la actividad de la caspasa-3, el mismo fenómeno ha sido reportado para progenitores de miocitos cardiacos en donde la Epo actúa como cardioprotector (Maddona R et al., 2009), en células del túbulo renal expuestas a ciclosporina (Pallet N et al., 2010) y en la línea celular de leucemia UT7 (Mori M et al., 2003).

El incremento en la actividad de caspasa-3 inducido por doxorubicina y daunorrubicina, sugiere que las células mueren por apoptosis. Por lo cual pensamos que el efecto quimiosensibilizador de la Epo podría ser mediado por alguna de las otras caspasas activadas durante la apoptosis; pues se ha reportado que los efectos de la Epo no están limitados a la actividad de la caspasa-3, ya que durante la diferenciación de los progenitores eritroides, la Epo activa de manera transitoria a las caspasas -2, -7 y -9 (Droin N et al., 2008). En base a las consideraciones anteriores decidimos determinar si el efecto sinérgico de Epo con las antraciclinas era mediado por la actividad del resto de caspasas.

La daunorrubicina fue capaz de activar a las caspasas -1, -2, -6, -8, -9 y -10, esto concuerda con los datos Gamen S et al., (2000) quienes reportaron por la técnica de western blot, un espectro similar de caspasas activadas por daunorrubicina y doxorubicina en la línea celular Jurkat, este trabajo observó la activación de las caspasas -2, -3, -4, 6, -7, -8, -9 y -10. A diferencia del trabajo de Gamen S, donde ambas antraciclinas activan a las mismas caspasas, nosotros observamos diferencias en el espectro de caspasas activadas por doxorubicina, pues además de inducir la actividad de las caspasas -1, -2, -6, -8, -9 y -10, la doxorubicina también activó a la caspasa-4; y promovió una mayor actividad de todas las caspasas con respecto a la daunorrubicina. El amplio espectro de caspasas, iniciadoras y efectoras, activadas por ambos quimiofármacos sugiere fuertemente que las células mueren por apoptosis, no obstante, resultaría

conveniente sustentar esta observación con algún otro método de detección de apoptosis.

Por otra parte, en las células de CaCu tratadas con los quimiofármacos y la Epo los resultados fueron diferentes. En el caso de la daunorrubicina observamos un ligero, pero significativo, incremento en la actividad de caspasa-1, lo cual resultó inesperado pues ésta caspasa suele participar en un tipo de muerte celular denominado piroptosis que tiene características de apoptosis y necrosis, y es activada por patógenos intracelulares (Saleh M et al., 2007). La caspasa-1 es una proteasa que activa y promueve la secreción de la interleucina 1- β (Kuranaga E et al., 2007), por tanto es difícil especular acerca de si este ligero incremento mediado por Epo en la actividad de caspasa-1, participa en el aumento de la actividad citotóxica de daunorubicina y doxorubicina. A la vez, este resultado está en desacuerdo con estudios *in vitro* que reportan que la Epo inhibe la activación de caspasa-1 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata donde actúa como neuroprotector (Chong ZZ et al., 2003).

En cuanto al resto de las caspasas analizadas, observamos una disminución estadísticamente significativa en la actividad de las caspasas-8, -9 y -10, inducidas por daunorrubicina y que participan en las vías de apoptosis extrínseca e intrínseca. Estos resultados contrastan con nuestra primera observación, pues esperábamos observar quizá una mayor actividad de caspasas en las células tratadas con Epo; a pesar de ello el hecho de que Epo disminuye la actividad de las caspasas-8 y-9, coincide con estudios realizados en neuronas de hipocampo de rata donde Epo disminuye la activación de caspasa -1, -3 y -8 (Chong Z et al., 2003), otro resultado similar se ha observado en endotelio cerebral donde Epo inhibe la activación de caspasa-9 (Chong Z et al., 2003). Por otra parte, hasta donde tenemos conocimiento, el efecto inhibitorio de la Epo sobre la caspasa-10 no se había reportado para células de CaCu o para otra línea celular.

En el caso de las células tratadas con doxorubicina y Epo, nuevamente observamos un incremento producido por la Epo en la actividad de caspasa-1, pero a diferencia de la daunorrubicina la Epo no afectó el resto de caspasas inducidas por doxorubicina; este resultado sugiere que a pesar de la similitud estructural entre los dos antineoplásicos estudiados, los mecanismos de acción difieren de tal manera que una misma dosis de Epo no ejerce el mismo efecto en la actividad de caspasas. Además nuestras observaciones indican que el incremento de citotoxicidad mediado por Epo no es dependiente de caspasas en esta línea celular.

Es importante señalar que a pesar de que la Epo disminuye la actividad de las caspasas -8, 9 y -10 inducidas por daunorrubicina, esto no implica necesariamente que las células no mueran por apoptosis, pues durante los ensayos de determinación de actividad de caspasas, observamos que la caspasa-3, la principal caspasa efectora, no es afectada por la Epo, lo cual pudiera deberse a que la Epo no disminuye la actividad de las caspasas iniciadoras hasta niveles basales, por tanto es posible que el remanente de actividad enzimática baste para activar a la caspasa-3. Otra posibilidad es que la activación de la caspasa-2, que también es una caspasa iniciadora con una función redundante en la vía intrínseca, y de acuerdo a nuestros resultados no es afectada por Epo, sea suficiente para activar a la caspasa-3 en las células tratadas con Epo y daunorrubicina.

Además del estudio *in vitro* de Carvalho G et al., (2005), un estudio del grupo de Sigounas G (2004) reportó que Epo es capaz de modular la actividad antitumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón tratado con cisplatino. Al finalizar el tratamiento observaron que el grupo que recibió Epo disminuyó de manera significativa 4 veces más el volumen y la masa de los tumores, con respecto al grupo que sólo recibió cisplatino. Además reportan que el uso de Epo tiende a disminuir la masa tumoral cuando se combina con mitomicina e ifosfamida. En conjunto las observaciones de estos grupos y nuestros resultados, sugieren fuertemente que la Epo es

capaz de desempeñar un papel opuesto al que generalmente se le había atribuido, pues dependiendo del linaje celular y el quimiofármaco con que Epo sea combinada, es capaz de incrementar la citotoxicidad o quimiosensibilizar a las células tumorales, contra la muerte inducida por la quimioterapia. Por tanto, es necesaria una comprensión más profunda del mecanismo de acción de los quimiofármacos y de cómo Epo modula su citotoxicidad, para diseñar tratamientos más efectivos y menos tóxicos para los pacientes.

X. PERSPECTIVAS.

En este trabajo evaluamos el efecto de Epo sobre 8 quimiofármacos (cada uno por separado) empleados en el tratamiento de CaCu. Sin embargo, es muy común que cuando el CaCu es recurrente, se empleen diferentes esquemas terapéuticos, que incluyen al cisplatino con algún otro antineoplásico; por ejemplo esquemas dobles como cisplatino con 5-fluorouracilo o ifosfamida, han mostrado respuestas favorables ante casos de CaCu recurrentes (Cadron I et al., 2007); dado que los 3 antineoplásicos poseen mecanismos diferentes, y de acuerdo a nuestras observaciones *in vitro* Epo no afecta la actividad de los últimos dos, resultaría interesante evaluar el efecto de Epo cuando es combinado con dos o más quimiofármacos. Algunos grupos de estudio podrían incluir el uso de oxaliplatino, que ha demostrado buenos resultados en CaCu recurrente o metastásico (Kuo DY et al., 2010), combinado con algún otro quimiofármaco, para el cual tampoco hallamos efectos citoprotectores cuando se combinan con Epo.

Por otra parte, sería interesante evaluar los efectos de la Epo a nivel de señalización en células de CaCu, pues aunque la Epo se ha vinculado a la activación de vías antiapoptóticas dentro de la familia de las MAP cinasas, Epo es capaz de activar las vías JNK y p38, asociadas a estrés celular y eventos inductores de apoptosis (Paul A et al., 1997, Nagata Y et al., 1997). La activación de JNK tiene como consecuencia la fosforilación de miembros de la familia AP1 como c-Jun (Payne CM et al., 1995; Jacobs-Helber SM et al., 1998), que también se ha reportado son activados por doxorubicina (Levina V et al., 2008). Por tanto sería importante evaluar la función de estos señalizadores mediante un western blot, para determinar si la activación de estas vías por Epo incrementa la citotoxicidad de la daunorrubicina y doxorubicina. Adicionalmente, JNK debe interactuar con otras vías que también son activadas por antineoplásicos, como lo es la vía del NF- κ B la cual de acuerdo al trabajo de Carvalho G et al., es inhibida por la eritropoyetina. Por

tanto NF- κ B constituye otra opción como mediador del efecto citotóxico de Epo. Dado que NF- κ B es un mediador de apoptosis y de necrosis, sería necesario determinar el tipo de muerte celular que es inducido o potenciado por Epo, para esto podríamos realizar un ensayo de anexina V.

Finalmente, existe evidencia que apoya el hecho de que la combinación de doxorrubicina y Epo, tiene dos efectos totalmente opuestos. De acuerdo a nuestros resultados *in vitro* la Epo incrementa la citotoxicidad de doxorrubicina y daunorrubicina sobre células de CaCu, en cambio se ha observado que la Epo es capaz de proteger al corazón de la atrofia cardiomiocítica, la infiltración de células inflamatorias y de la degeneración y pérdida de proteínas contráctiles, todo ello resultado del tratamiento con doxorrubicina (Lil L et al., 2006). Por tanto, resultaría conveniente evaluar en modelo *in vivo* si Epo es capaz de conservar ambos efectos, citoprotector en cardiomiocitos y quimiosensibilizador en tumores de CaCu. Si esto sucede el uso de antraciclinas y Epo, representaría una opción viable en el tratamiento de tumores de este tipo, pues significaría una disminución en las dosis empleadas de estos quimiofármacos, lo que a su vez disminuye el riesgo de presentar cardiotoxicidad.

XI. CONCLUSIONES.

1. La Epo ejerce diferentes efectos sobre la muerte inducida por los quimiofármacos empleados en el tratamiento de CaCu.

- Por una parte, la Epo no afecta la muerte celular inducida por los quimiofármacos: carboplatino, oxaliplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina e ifosfamida en la línea celular HeLa.
- Sin embargo, Epo es capaz de potenciar la citotoxicidad de la doxorubicina y daunorrubicina en la misma línea celular.

2. Tanto daunorrubicina como doxorubicina son capaces de inducir la actividad de caspasa-3, la cual es empleada como marcador de apoptosis, por ser la principal caspasa efectora.

3. La Epo no afecta la actividad de caspasa-3 inducida por daunorrubicina y doxorubicina, lo que indica que el incremento de la citotóxicidad de las antraciclinas mediado por Epo, es independiente de caspasa-3.

4. Daunorrubicina induce la activación de las caspasas-1, -2, -6, -8, -9 y -10.

5. Doxorubicina induce la activación de las caspasas-1,-2, -4, -6, -8, -9 y -10. De manera general doxorubicina induce una mayor actividad de éstas enzimas en comparación con daunorrubicina.

6. La Epo no afecta la actividad de ninguna de las caspasas inducidas por doxorubicina, en cambio es capaz de disminuir la actividad de las caspasas-8, -9 y 10 inducidas por daunorrubicina.

7. El incremento de citotóxicidad de daunorrubicina y doxorubicina mediado por Epo, es independiente de un incremento en la actividad de caspasas.

XII. APÉNDICES.

I. Inactivación del suero fetal bovino.

Para inactivar el suero fetal bovino, se incubo durante 30min a 56°C, posteriormente fue almacenado a 4°C.

II. Búfer de fosfatos (PBS).

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

KH₂PO₄ 2 mM

III. Verseno.

EDTA 1 mM

NaCl 170 mM

KCl 3 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

IV. Solución de MTT.

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

REFERENCIAS.

- Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts LP, Clements E, Wong K and Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3561-5.
- Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, and Verma A. Hypoxia-Inducible Erythropoietin Signaling in Squamous Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix and Its Potential Role in Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Am J Pathol.* 2003; 162: 1789–1806.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.) *Molecular biology of the cell.* EUA: Garland Science, 2002.
- Andrews P and Howell S Cellular pharmacology of cisplatin: Perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells* 1990; 2: 35–43.
- Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. Expressions of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 999-1007.
- Barlett, D. L. & Steele, J. B. Why we pay so much for drugs. *Time* 2004; 163, 45–52.
- Barton-Burke M, Wilkes G, Ingwersen K (Eds). *Cancer chemotherapy: a nursing process approach* (3ra ed.). EUA: Jones and Bartlett publisher, Inc.
- Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 2003; 83:1477-1487.
- Baseman JG and Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virology* 2005; 32s: S16-S24.
- Beck I, Weinmann R, Caro J. Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-Kd nuclear DNA-binding protein in erythropoietin producing and nonproducing cells. *Blood* 1993; 82: 704-711.
- Bergelson S, Klingmuller U, Socolovsky M, Hsiao JG, Lodish HF. Tyrosine Residues within the Intracellular Domain of the Erythropoietin Receptor Mediate Activation of AP-1 Transcription Factors. *J Biol Chem* 1998; 273: 2396-2401.
- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32S:S1–S6.
- Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2571-2575.
- Bittorf, T., Jaster, R., and Brock J. Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Cell Signal* 1994; 6: 305–311.
- Blohmer JU, Wurschmidt F, Petry G. Results with sequential adjuvant chemo-radiotherapy with vs without epoetin alfa for patients with high-risk cervical cancer: results of a prospective, randomized, open and controlled AGO- and NOGGO-intergroup study [abstract]. *Ann Oncol* 2004; 15(Suppl. 3):iii128. Abstract 477.
- Blumber N, Heal J, Chuang C, Murphy P, Agarwal M. Further Evidence Supporting a Cause and Effect Relationship Between Blood Transfusion and Earlier Cancer Recurrence. *Annals of surgery* 1988, 207: 410-415.
- Bohlius J, Langensiepen S, Schwarzer G, Seidenfeld J, Piper M, Bennet C, Engert A. Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive metanalysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 489-498.
- Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A, Repetto L, Soubeyran P, European Organization for research and Treatment of Cancer (EORTC) Taskforce for the Elderly EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *Eur J Cancer* 2007; 43: 258–270.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel Mort1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803–815.
- Bottomley A, Thomas R, van SK, Fletcher H, Djulvego B. Human recombinant erythropoietin and quality of life: a wonder drug or something to wonder about? *Lancet Oncolgy* 2002; 3:145-153.
- Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 3–13.
- Browder T, Butterfield CE, Kråling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al.

- Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer, *Cancer Res* 2000; 60: 1878–1886.
- . Burrows L, Tartter P. Effects of blood transfusion on the colonic malignancy recurrence rate. *Lancet* 1982;ii:662.
 - Bush RS. The significance of anemia in clinical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 2047–2050.
 - Busch, M. P., Kleinman, S. H. & Nemo, G. J. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA* 2003; 9: 959–962.
 - Campbel KJ, Rocha S, Perkins ND. Active Repression of Antiapoptotic Gene Expression by RelA (p65) NF- κ B. *Mol Cell* 2004.18: 853-865.
 - Candelaria M, Cetina L, Dueñas-González A. Anemia in cervical cancer patients: implications for iron supplement therapy. *Med Oncol.* 2005; 22: 161-8.
 - Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: A systemic, quantitative review. *Cancer* 2001; 91: 2214–2221.
 - Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Métivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G. Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. *Oncogene* 2005; 24:737–45.
 - Chen JR, Yang YC, Chen TC, Lai JC, Chang SJ, Chang CL, Wang KL. Salvage chemotherapy in recurrent cervical cancer with biweekly pegylated liposomal Doxorubicin (lipo-dox). *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2008; 47: 322-326.
 - Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Mol Brain Res* 2000; 81:29–42.
 - Chong ZZ, Lin S, Kang J, Maiese K. Erythropoietin Prevents Early and Late Neuronal Demise Through Modulation of Akt1 and Induction of Caspase 1, 3, and 8. *J Neuroscience Res* 2003; 71:659–669.
 - Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23:320-30.
 - Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM. Expression of erythropoietin b in the human placenta. *FASEB J* 1996; 10: 760-768.
 - Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ. Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J Virol* 1988; 62: 84–90.
 - Cummings PD, Wallace EL, Schorr JB, Dodd RY. Exposure of patients to human immunodeficiency virus through the transfusion of blood components that test antibody-negative. *N Engl J Med.* 1989; 321:941-946.
 - Damen, J. E., Cutler, R. L., Jiao, H., Yi, T., and Krystal, G. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI3-kinase activity. *J Biol Chem* 1995; 270: 23402–23408.
 - de Campos E, Radford J, Steward W, Milroy R, Dougal M, Swindell R, Testa N, Thatcher N. Clinical and in vitro effects of recombinant human erythropoietin in patients receiving intensive chemotherapy for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1995 ;13: 1623-1631.
 - De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993; 49:303–310.
 - de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
 - Dessypris, E. N., and Krantz, S. B. Effect of pure erythropoietin on DNA-synthesis by human marrow day 15 erythroid burst forming units in short-term liquid culture. *Br J Haematol* 1984; 56: 295–306.
 - Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell. Mol. Life Sci* 2002; 59: 1914-1927.
 - Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr, Reitz BA, Nelson KE. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327(6): 369-373.
 - Doorbar J. The papilloma virus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32S: S7-S15.
 - Dowdy SC, Boardman CH, Wilson TO, Podratz KC, Hartmann LC, Long HJ. Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 1167-73.
 - Droin N, Cathelin S, Jacquelin A, Guéry L, Garrido C, Fontenay M, Hermine O, Solary E. A role for caspases in the differentiation of erythroid cells and macrophages. *Biochimie* 2008; 90: 416-422
 - du Bois A, Pfisterer J, Burchardi N, Loibl S, Huober J, Wimberger P, Burges A, Stähle A,

- Jackisch C, Kölbl H; Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom; Kommission Uterus. Combination therapy with pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin in gynecologic malignancies: a prospective phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and Kommission Uterus (AGO-K-Ut). *Gynecol Oncol* 2007; 107: 518-25.
- Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fisher S, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J Biol Chem* 1992; 267:10670-10675.
 - Dusanter-Fourt I, Muller O, Ziemiecki A, Mayeux P, Drucker B, Djiane J, Wilks A, Harpur AG, Fisher S, Gisselbrecht S. Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *EMBO* 1994; 13: 2583-2591.
 - Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-κB. *Oncogene* 2006; 25: 6800-6816.
 - Eastman A. The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis, in *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Bernhard Lippert ed) 1999. pp 111–134.
 - Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999; 94: 1864-1877.
 - Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003; 207:251–254.
 - Evans IC, Bergsjø P. The influence of anemia on the results of radiotherapy in carcinoma of the cervix. *Radiology* 1965; 84:709–717.
 - Eifel PJ, Winter K, Morris M, Levanback C, Grigsby PW, Cooper J, Rotman M, Gershenson D, Mutch DG. Pelvic Irradiation With Concurrent Chemotherapy Versus Pelvic and Para-Aortic Irradiation for High-Risk Cervical Cancer: An Update of Radiation Therapy Oncology Group Trial (RTOG) 90-01. *J Clin Oncol* 2004; 22:872-880.
 - Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 699–717.
 - Fairbanks LD, Rückemann K, Qui Ying, Hawrilowicz M, Richards D, Swaminathan R, Kirshbaums B, Simmonds HA. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis?. *Biochem J* 1999; 342: 143-152.
 - Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004; 9: 18-30.
 - Fisher D. E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994, 78: 539–542.
 - Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
 - Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 2002; 76:10009–10014.
 - Föllner M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*. 2008;60: 661-668.
 - Frommhold H, Guttenberger R, Henke M. The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy: The Freiburg experience. *Strahlenther Onkol* 1998;174(Suppl. 4):31–34.
 - Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Oxaliplatin, a Potent Inhibitor of Survivin, Enhances Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Catastrophe in Colon Cancer Cells. *Jpn J Clin Oncol*. 2005; 35: 453–463.
 - García M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RI. *Global Cancer Facts and Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2007.
 - Gamen S, Anel A, Pérez-Galán P, Lasiera P, Johnson D, Piñeiro A, Naval J. Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. *Exp Cell Res*. 2000;258:223-35.
 - Gately DP and Howell SB Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer*. 1993, 67: 1171–1176.
 - Glaspy J, Degos L, Dicato M, Demetri GD. Comparable efficacy of epoetin alfa for anemic cancer patients receiving platinum- and nonplatinum-based chemotherapy: a retrospective subanalysis of two large,

- community-based trials. *Oncologist*. 2002; 7:126-35.
- Genestier L, Palliot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells.. *Clin. Invest*. 1998; 102: 322-328.
 - Gewirtz DA, Di X, Walker TD, Sawyer ST. Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2232-2238.
 - González Barón M and Ordóñez Gallego A (Coordinadores). *Astenia Tumoral*. Madrid: Médica Panamericana, 2004.
 - González VM, Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Mol Pharmacol* 2001; 59 (4): 657-663.
 - Greer PJ, Foerster j, Lukens NJ, Rodgers MG, Paraskevas F, Glader B. *Wintrob's Clinical Hematology*. 11 ed. Lippincott Williams&Wilkins,USA, 2004.
 - Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, et al. Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: Results of a retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16:37-42.
 - Grau C, Overgaard J. Significance of hemoglobin concentrations for treatment outcome. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Implications for clinical radiooncology*. Berlin: Springer, 1998: 101-112.
 - Grigsby PW, Herzog TJ. Current management of patients with invasive cervical carcinoma. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2001; 44: 531-537.
 - Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol Chem* 2002; 277, 13430-13437.
 - Gupta S, Singh PK, Bisht SS, Bhatt MLB, Pant MC, Gupta R, Gupta D, Negi MPS. Role of recombinant human erythropoietin in patients of advanced cervical cancer treated "by chemoradiotherapy". *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8:1, 1-5
 - Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, George J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *European Heart Journal* 2006; 27: 1876-1883.
 - Hardee ME, Kirkpatrick JP, Shan SI. Human recombinant erythropoietin (rEpo) has no effect on tumor growth or angiogenesis. *Br J Cancer* 2005; 93: 1350 -1355.
 - Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin Biology in Cancer. *Rew. Clin Cancer Res* 2006; 12: 332-39.
 - Heiss M, Mempel W, Delanoff C, Jauch KW, Gabka C, Mempel M. Blood transfusion modulated tumor recurrence—a randomized study of autologous blood transfusion in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1859-67.
 - Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003 362:1255-60.
 - Henkels KM and Turchi JJ. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*1999; 59:3077-3083.
 - Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 139-58.
 - Hortobagyi GN. Anthracycline in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997; 54: 1-7.
 - Hudis CA, Vogel CL, Gralow JR, Williams D; Procrit Study Group. Weekly epoetin alfa during adjuvant chemotherapy for breast cancer: effect on hemoglobin levels and quality of life. *Clin Breast Cancer*. 2005; 6:132-42.
 - Jackson, R. C. and Grindey, G. B. *Folate Antagonists as Therapeutic Agents*.1984; Vol 1, pp. 289-315. Academic Press, New York.
 - Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J., and Sawyer, S. T. AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol. Cell. Biol* 1998; 18: 3699-3707.
 - Jamieson ER and Lippard SJ. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev*. 1999; 99: 2467-2498.
 - Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-489.
 - Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation

- by vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991; 51:2212–2222.
- Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariate analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983;9:445–55
 - Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol/Hematol* 1993; 15: 191–219.
 - Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol. Cell.*1998 1:543–551.
 - Kinlen LJ, Spriggs AI. Women with positive cervical smears but without surgical intervention. A follow-up study. *Lancet* 1978; 2(8087):463–465.
 - Klaiman G, Petzke TL, Hammond J, Leblanc AC. Targets of caspase-6 activity in human neurons and Alzheimer disease. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7:1541-55.
 - Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80: 729-738.
 - Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri Es, Slapak CA, Teicher B, Kufe D and Datta, R. Abrogation of mitochondrial cytochrome C release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 1998; 273: 16647–16650.
 - Kuo DY, Blank SV, Christos PJ, Kim M, Caputo TA, Pothuri B, Hershman D, Goldman N, Ivy PS, Runowicz CD, Muggia F, Goldberg GL, Einstein MH. Paclitaxel plus oxaliplatin for recurrent or metastatic cervical cancer: a New York Cancer Consortium Study. *Gynecol Oncol*. 2010; 116: 442-446.
 - Kuranaga E, Miura M. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 135–144.
 - Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 22–28.
 - Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenberghe P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 2002; 9: 358–361.
 - Landoni F, Maneo A, Colomb A, et al. Randomized study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet*. 1997; 350: 535–540.
 - Landoni F, Maneo A, Cormio G, et al. Class II versus Class III radical hysterectomy in Stage IB-IIA cervical cancer: A prospective randomized study 1,2. *Gynecol Oncol* 2001; 80: 3–12.
 - Larsson A-M, Landberg G, Pahlman S, Albertsson M. Erythropoietin enhances response to treatment in patients with advanced breast cancer. *Acta Oncol* 2005; 43:594-597.
 - Lavey Rs, Liu PY, Greer BE, Robinson WR, Chang PC, Wynn RB, Conrad ME, Jiang C, Markman M, Alberts DS. Recombinant human erythropoietin as an adjunct to radiation therapy and cisplatin for stage IIB–IVA carcinoma of the cervix: a Southwest Oncology Group study *Gynecologic Oncology* 2004; 95:145–151.
 - Lemos ML, editor. B.C. Cancer Agency Cancer Drug Manual. Vancouver, British Columbia: B.C. Cancer Agency. Available from <http://www.bccancer.bc.ca>. Accessed August 29, 2006.
 - Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Hockel M. Expression of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Cervical Cancer and Relationship to Survival, Hypoxia, and Apoptosis. *Clin Canc Res* 2006; 12: 6894-6900.
 - Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 2003; 4: 459-60.
 - Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 3850–3855.
 - Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 113: 535–43.
 - Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91: 479-489.
 - Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*. 2006 ;71: 684-694.
 - Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B. Effects of

- epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2865–2874.
- Littlewood TJ, Nortier J, Rapoport B, Pawlicki M, de Wasch G, Vercammen E, Schuette W, Wils J, Freund M. Epoetin alfa corrects anemia and improves quality of life in patients with hematologic malignancies receiving non-platinum chemotherapy. *Hematol Oncol*. 2003; 21:169-180.
 - Longe L Jaqueline, editor. *The Gale encyclopedia of cancer: a guide to cancer and its treatments*. pp 64-66, Vol. 1, 2nd ed., Thompson Gale, 2005.
 - López MA, López E. Dosis altas de eritropoyetina-b semanal en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en remisión que reciben quimioterapia; efecto sus requerimientos transfusionales *Medicina Mexicana interna* 2008; 24: 375-380.
 - Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 231–41.
 - Madonna R, Shelat H, Xue Q, Willerson JT, De Caterina R, Geng YJ. Erythropoietin protects myocardium-expressing cardiac stem cells against cytotoxicity of tumor necrosis factor- α . *Exp Cell Res* 2009; 315: 2921-2928.
 - Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, et al. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 2001; 98: 28724.
 - Mayer G, Thum J, Cada EM, et al. Working capacity is increased following recombinant human erythropoietin treatment. *Kidney Int* 1989; 111: 992.
 - Marsden DE, Friedlander M, Hacker NF. Current management of epithelial ovarian carcinoma: a review. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 11–19.
 - Masquelier M, Zhou QF, Gruber A, Vitols S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67: 1047-1056.
 - Masuda S, Okano M, Yamagishi K, et al. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes *J Biol Chem* 1994; 269:19488-19493.
 - Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997; 89:3148-3154
 - Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al. Children’s Cancer Group. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cisretinoic acid. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1165-1173.
 - Meynard D, Morvan V, Bonnet J, Robert J. Functional analysis of the gene expression profiles of colorectal cancer cell lines in relation to oxaliplatin and cisplatin cytotoxicity. *Oncol Rep* 2007; 17:1213-1221.
 - Micetich KC, Barnes D, Erickson LC. A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effect of cis-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum (II) and cis-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells. *Cancer Res* 1985; 45: 4043–4047.
 - Misset JL, Bleiberg H, Sutherland W, Bekradda M, Cvitkovic E. Oxaliplatin clinical activity: a review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000; 35: 75-93.
 - Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 2002; 21:4754–4762.
 - Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 2003; 195:290-297.
 - Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997; 273:R1829–R1844
 - Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med* 1998. 188: 2033–2045.
 - Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 7888–98.
 - Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–527.
 - Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312):1093–101.
 - Murphy GP, Lawrence W Jr and Lenhard RE (Eds.), *American Society Textbook of*

- Clinical Oncology, 2nd Ed. American Cancer Society, Atlanta, GA, 1995.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Scaffidi C et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817–827.
 - Myers G, Bernard H-U, Delius H, Favre M, Icenogel J, Van Ranst M, Wheeler C, editors. Human papillomaviruses a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 1st ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1994.
 - Nagai T, Okubo T, Sakaguchi R, Seki H, Takeda S. Glassy cell carcinoma of the uterine cervix responsive to neoadjuvant intraarterial chemotherapy. *Int J Clin Oncol* 2008; 13:541-544.
 - Oliver FJ, Collins MK, López-Rivas A. dNTP pools imbalance as a signal to initiate apoptosis. *Experientia*. 1996; 52(10-11):995-1000.
 - Olson RD, Mushlin P. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J*. 1990; 4: 3076–3086.
 - Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Choukroun G, Martinez F. Antiapoptotic properties of recombinant human erythropoietin protects against tubular cyclosporine toxicity. *Pharmacological Research* 2010; 61: 71–75
 - Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR et al. *Cell Death Differ* 2006; 13: 712–729.
 - Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J (Eds): Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC, 1997.
 - Paul A, Wilson S, Belsham CM, Robinson CJ., Scott PH, Gould GW, Plevin R. Stress-activated protein kinases: Activation, regulation and function. *Cell Signal* 1997; 9: 403–410.
 - Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Rev*. 2008, 34: 603-613.
 - Pedersen D, Sogaard H, Overgaard J, Bentzen SM. Prognostic value of pretreatment factors in patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy alone. *Acta Oncol* 1995;34:787–795
 - Pestell KE, Hobbs SM, Titley JC, Kelland LR and Walton MI. Effects of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol* 2000; 57:503–511.
 - Petersen O. Spontaneous course of cervical precancerous conditions. *Am J Obstet Gynecol* 1956; 72(5):1063–71.
 - Pirker R, Ramlau RA, Schuette W, Zatloukal P, Ferreira I, Lillie T, Vansteenkiste JF. Safety and efficacy of darbepoetin alpha in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer treated with platinum plus etoposide. *J Clin Oncol*. 2008 ;26: 2342-2349.
 - Pritchard D.M, Watson AJ, Potten C S, Jackman A L, Hickman JA. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: Evidence for the involvement of RNA perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 1795-1799
 - Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998; 25: 4–12
 - Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 6100–6102, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1083
 - Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999; 283:990-993.
 - Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, Seidenfeld J, Bohlius J, Bennett CL, Cella DF, Djulbegovic B, Goode MJ, Jakubowski AA, Rarick MU, Regan DH, Lichtin AE. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood* 2008; 111:25-41.
 - Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen panel. *Biochem Pharmacol* 1990; 52: 1855-1865.
 - Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*. 2001; 4: 303–313.
 - Rosenberg BL, Van Camp JE, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of antitumour agents. *Nature*. 1969; 222: 385–386.
 - Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes

- on, in Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug (Bernhard Lippert ed) 1999; pp 3–27, Wiley-VCH, Basel, Switzerland.
- Riccardi R, Riccardi A, Di Rocco C, Carelli G, Tartaglia RL, Lasorella A et al. Cerebrospinal fluid pharmacokinetics of carboplatin in children with brain tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1992; 30: 21–24.
 - Rückemann K, Qiu Y, Hawrylowicz CM, Richards DF, Swaminathan R, Kirschbaums B, Simmonds A. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes : a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis ?. *Biochem J* 1999; 342: 143-152.
 - Saintigny P, Besse B, Callar P, Vergnaud AC, Czernichow S, Colombat M, Girard P, Validire P, Breau JC, Bernaudin JF, Soria JC. Erythropoietin and Erythropoietin Receptor Coexpression Is Associated with Poor Survival in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Can Res* 2007; 13:4825-4831.
 - Saleh M, Green DR. Caspase-1 inflammasomes: choosing between death and taxis. *Cell Death Differ.* 2007;15:59-1560.
 - Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277: 665–667.
 - Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N, Tasaka K. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45:199–206.
 - Seongeun Lee, Myungin Baek, Hae-Yeong Kim, Ji-Hong Ha & Doo-Il Jeoung. Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis. *Biotechnology Letters.* 2002; 24: 1147–1151.
 - Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726–735.
 - Sigounas G, Sallah S, Sigounas VY. Erythropoietin modulates the anticancer activity of chemotherapeutic drugs in a murine lung cancer model. *Cancer Lett.* 2004;214:171-9.
 - Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem Pharmacol.* 1993; 46:375-82.
 - Sladek, N. E. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol. Ther* 1988; 37: 301-355.
 - Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998; 339: 900–905.
 - Solar P, Feldman L, Jeong JY, Busingye JR, Sytkowski AJ. Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *Int J Cancer.* 2008; 122: 281-288.
 - Stanley MA, Browne HM, Appleby M, Minson AC. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* 1989; 43:672–676.
 - Stat bite: worldwide cervical and uterine cancer incidence and mortality, 2002. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1031.
 - Strauss HG, Haengsgen G, Dunst J, Hayward CRW, Burges HU, Scherhag A, Koelbl H, Effects of anemia correction with epoetin beta in patients receiving radiochemotherapy for advanced cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18, 515–524.
 - Sui, X., Krantz, S. B., You, M., and Zhao, Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 1998; 92:1142–1149
 - Szumiel I, Nias AHW: The effect of combined treatment with a platinum complex and ionizing radiation on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Br J Cancer* 1976; 33: 450-458.
 - Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; 98:181-91
 - Takano M, Kikuchi Y, Kita T, Goto T, Yoshikawa T, Kato M, Watanabe A, Sasaki N, Miyamoto M, Inoue H, Ohbayashi M. Complete remission of metastatic and relapsed uterine cervical cancers using weekly administration of bevacizumab and paclitaxel/carboplatin. *Onkologie.* 2009; 32(10):595-7.
 - Tao X, Hu W, Ramirez PT, Kavanagh JJ. Chemotherapy for recurrent and metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2008; 110: S67–S71.
 - Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee Y-C, Abulafia O. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16:1855–1861.
 - Temple RM, Deary IJ, Winney RJ. Recombinant erythropoietin improves cognitive function in patients maintained on chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10: 1733-1738.

- Ting-Chang Chang, Chyong-Huey Lai, Ji-Hong Hong, Suei Hsueh, Kuan-Gen Huang, Hung-Hsueh Chou, Chih-Jen Tseng, Chien-Sheng Tsai, Joseph T. Chang, Cheng-Tao Lin, Huei-Hsin Chang, Pei-Jung Chao, Koon-Kwan Ng, Simon Guo-Jeng Tang, and Yung-Kwei Soong. Randomized Trial of Neoadjuvant Cisplatin, Vincristine, Bleomycin, and Radical Hysterectomy Versus Radiation Therapy for Bulky Stage IB and IIA Cervical Cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1740-1747.
- The Health's Profesional's HPV HANDBOOK, I: Human papillomaviruses and cervical cancer 2004. The European Consortium for Cervical Cancer education Taylor & Francis Gropup.
- Thigpen T, Shingleton H, Homesley H, et al: Cisplatin in the treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1981; 48:899-903.
- Thomas M, Banks L. Inhibition of bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998; 17: 2943-54.
- Tina E, Prenkert M, Höglund M, Paul C, Tidefelt U. Topoisomerase IIalpha expression in acute myeloid leukaemia cells that survive after exposure to daunorubicin or ara-C. *Oncol Rep* 2009; 22:1527-31.
- Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó A, Tímár J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 2005; 65: 7186-93.
- Umemura T, Umene K, Takahira H, Takeichi N, Katsuno M, Fukumaki Y, Nishimura J, Sakaki Y., Ibayashi H. Hematopoietic growth factors (BPA and Epo) induce the expressions of c-myc and c-fos proto-oncogenes in normal human erythroid progenitors. *Leuk. Res* 1988; 12:187-194.
- Vázquez Mellado-Petit MJ. Efecto de la eritropoyetina humana recombinante sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción (Tesis de licenciatura). 2009.
- Voravud N, Sriuranpong V, Suwanrusme H. Antianemic effect of once weekly regimen of epoetin alfa 40,000 units in anemic cancer patients receiving chemotherapy. *J Med Assoc Thai*. 2007; 90:1082-1088.
- Wang C.-Y, Mayo M, Baldwin A. TNF- and cancer therapy induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-κB. *Science* 1996; 274:784-787.
- Wataya Y, Watanabe K, Yoshida S, Hiramoto-Yoshioka A. dNTP imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1989; 21:11-12.
- Westfall SD, Skinner MK. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(11):1764-1771.
- Wiernik PH, Dutcher JP, Clinical importance of anthracyclines in the treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1992; 6 (Suppl 1): 67-69.
- Willmott LJ, Monk BJ. Cervical cancer therapy: current, future and anti-angiogenesis targeted treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9:895-903.
- Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995; 377:242-6.
- Wu H, Klingmuller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1806-10.
- Wun T, Law L, Harvey D, Sieracky B, Scudder SA, Ryu JK. Increased Incidence of Symptomatic Venous Thrombosis in Patients with Cervical Carcinoma Treated with Concurrent Chemotherapy, Radiation, and Erythropoietin. *Cancer*. 2003; 98:1514-20.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331.
- Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273:25381 ^ 7.
- Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, et al. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 873-885.
- Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G1 phase cell cycle arrest. *Oral oncology*. 2008, doi:10.1016/j.oraloncology.2008.04.002.
- Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, Wataya Y. The mechanism of dNTP-unbalanced cell death induced by 5-fluorouracil and its derivatives. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1985; 16: 245-248.
- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers

the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117:349–60.

- Yu L, Tan GS, Xiang XH, Guo WB, Li HP, Huang YH, Yang JY. Comparison of uterine artery chemoembolization and internal iliac arterial infusion chemotherapy for the combining treatment for women with locally advanced cervical cancer. *Chin J Cancer*. 2009; 28: 402-407.
- Zhang J, Tian Q, Zhu YZ, Xu AL, Zhou SF. Reversal of resistance to oxazaphosphorines. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6: 385-407.

