



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DEL EFECTO INDUCTOR DE LA APOPTOSIS DE LA 7-
HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA
PULMONAR HUMANO A-549 MEDIANTE LA TÉCNICA DE
MICROINYECCIÓN EN CÉLULA ÚNICA POR MICROSCOPIA DE
EPIFLUORESCENCIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

KAREN AZUCENA DÍAZ MORALES



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: Profesora: Gloria Gutiérrez Venegas

SECRETARIO: Profesor: Juan Arcadio Molina Guarneros

1er. SUPLENTE: Profesora: María Eva González Trujano

2° SUPLENTE: Profesora: Julio César Martínez Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE INMUNOFARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

BECARIA DEL PROYECTO CONACYT 98729

BECARIA DEL PROYECTO PAPIIT IN216812

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

SUPERVISORA TÉCNICA:

M. en C. Maribel Soto Núñez

SUSTENTANTE:

Karen Azucena Díaz Morales

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	5
II. INTRODUCCIÓN.....	6
1) Planteamiento del problema.....	6
2) Objetivos.....	6
3) Hipótesis.....	7
III. Marco teórico.....	8
1) Apoptosis.....	8
A. Caspasas.....	9
B. Etapas de la apoptosis.....	10
C. Regulación de la apoptosis.....	13
D. Apoptosis y cáncer.....	15
2) Cáncer de pulmón.....	15
A. Origen molecular.....	16
B. Causas.....	16
C. Epidemiología.....	17
D. Clasificación de cáncer de pulmón.....	18
3) Cumarinas.....	19
A. Cumarinas y cáncer de pulmón.....	22
4) Microinyección.....	24
A. Micropuntas.....	25
5) Fluorescencia.....	26
IV. PRODECIMIENTO EXPERIMENTAL.....	28
1. Línea celular.....	28
2. Equipo.....	28
3. Material.....	28
4. Reactivos.....	29
5. Software.....	30
6. Procedimientos.....	30
A. Cultivo celular.....	30
B. Elaboración de micropuntas.....	30

C.	Determinación de tiempo y presión de microinyección	31
D.	Tratamiento de células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 con 7-hidroxycumarina	32
E.	Microinyección de células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 expuestas a 7-hidroxycumarina o a su disolvente	33
7.	Análisis de Imágenes	33
8.	Análisis estadístico	34
V.	RESULTADOS.....	35
1.	Elaboración de micropuntas.....	35
2.	Determinación de los parámetros de microinyección	36
3.	Cinética de la actividad de caspasa 3 con microinyección en célula única.....	37
A.	Cinética de activación de caspasa 3 sin exposición a 7-hidroxycumarina.....	37
B.	Cinética de activación de caspasa 3 por la exposición a 7-hidroxycumarina	38
4.	Análisis de la velocidad inicial de la cinética de caspasa 3	46
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
VII.	CONCLUSIONES.....	55
VIII.	REFERENCIAS	57
IX.	GLOSARIO.....	60

I. ABREVIATURAS

APAF-1: *apoptosis protease-activating factor -1*

ATP: adenosín trifosfato

Bcl-2: *B cells lymphoma 2*

CARD: dominios de reclutamiento de caspasas

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CD95: *cluster* de diferenciación

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

c-MYC: oncogén de mielocitomatosis

CO₂: dióxido de carbono

CYP2A6: citocromo P450 (2A6)

DED: dominios efectores de muerte

DD: dominios de muerte

DMEM: *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido dietilenaminotetraacético

EtOH: etanol

FADD: proteína asociada a Fas con dominio de muerte

HCl: ácido clorhídrico

IAP: proteína inhibidora de apoptosis

ICAD: *inhibitor of caspase-3-activated DNase* (proteína inhibidora de la DNAsa activada por casapasa-3)

Kg: kilogramo

M: molar

mg: miligramo

mL: mililitro

mM: milimolar

NaOH: hidróxido de sodio

PBS: solución amortiguadora de fosfatos

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

RPMI-1640: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute-1640*

Psi: libra por pulgada cuadrada

SFB: suero fetal bovino

TDI: ingesta diaria tolerable

TNF: factor de necrosis tumoral

TRAIL-R1: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand receptor1

TRAIL-R2: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand receptor 2

7-OHC: 7-hidroxicumarina

µg: microgramo

µM: micromolar

Z-DEVD-R110: sustrato específico de caspasa 3 acoplado a rodamina 110

II. INTRODUCCIÓN

1) Planteamiento del problema

Se han descrito propiedades apoptóticas de algunas cumarinas simples, (cumarina y la 7-hidroxycumarina) en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 (Marshall, 1994). Sin embargo, no se ha documentado cómo ocurre este proceso a nivel celular *ex vivo*. En este trabajo se utiliza la técnica de microinyección en célula única y la microscopía de epifluorescencia, como una propuesta para el estudio de la actividad de la caspasa 3 por efecto de la exposición a 7-hidroxycumarina.

2) Objetivos

Objetivo general

- Determinar la dinámica *ex vivo* de la actividad específica de la caspasa 3 inducida por el tratamiento con 7-hidroxycumarina en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549, mediante la técnica de microinyección en célula única por microscopía de epifluorescencia.

Objetivos particulares

- Desarrollar la técnica de microinyección en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 como herramienta para la realización de estudios *ex vivo* de Farmacología celular.

- Obtener los cursos temporales de activación de la caspasa 3 en células tratadas con 7-hidroxicumarina, disuelta en etanol.
- Obtener el registro y el análisis de imágenes de la dinámica *ex vivo* de este proceso mediante microfotografía digital.

3) Hipótesis

Hipótesis General

Existe un incremento estadísticamente significativo en la inducción de la actividad de la caspasa 3 entre las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas con 7-hidroxicumarina disuelta en etanol y las células expuestas a su control.

H_0 : Entre las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas con 7-hidroxicumarina disuelta en etanol o sólo con su vehículo, no hay diferencia estadísticamente significativa en la inducción de la actividad de la caspasa 3, cuantificada mediante la técnica de microinyección en célula única por microscopía de epifluorescencia.

H_1 : Entre las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas con 7-hidroxicumarina disuelta en etanol o con su vehículo, sí hay diferencia estadísticamente significativa en la inducción de la actividad de la caspasa 3, cuantificada mediante la técnica de microinyección en célula única por microscopía de epifluorescencia.

III. Marco teórico

1) Apoptosis

La apoptosis es un proceso celular de muerte programada en el cual las células son inducidas a una especie de suicidio no necrótico. En organismos multicelulares muchos de los mecanismos que controlan la homeostasis de los tejidos, están ligados a procesos apoptóticos (Nasr T, 2014).

La apoptosis se caracteriza por diferentes cambios morfológicos que terminan con la muerte de la célula (Bröker L, 2005). La membrana plasmática es una de las estructuras celulares donde se hacen más evidentes los efectos de toda la serie de modificaciones bioquímicas que constituyen la apoptosis. La célula adquiere un aspecto típicamente apoptótico, caracterizado por la disminución de tamaño, el aislamiento respecto de las células que la limitan (en el caso que éstas sean adherentes) y el aspecto esférico de su forma. Se generan también unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana, que se denominan *blebs* (Evan G, 2001). Se sabe que durante la apoptosis se produce una reorganización del citoesqueleto por la proteólisis de muchos de sus componentes generando este tipo de estructuras. En las células inducidas a apoptosis también se producen cambios en la simetría de la membrana. La bicapa lipídica que forma la membrana plasmática tiene una composición y orientación determinada. De los fosfolípidos que conforman la membrana citoplasmática, los que contienen colina, esfingomiolina y fosfatidilcolina, están orientadas al exterior, mientras que la mayoría de los aminofosfolípidos, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina, están orientados al

interior. Esta orientación de la membrana no es un hecho estático, sino que es el resultado de una dinámica en la que continuamente los fosfolípidos se mueven cruzando la membrana en ambas direcciones hasta conseguir el equilibrio que garantice la correcta arquitectura. Durante la apoptosis, ocurre una pérdida de la simetría de la membrana y por lo tanto una exteriorización de aminofosfolípidos como uno de los fenómenos más precoces. Este evento es muy importante para el proceso general de la apoptosis, ya que “marca” a las células para su posterior fagocitosis (Bröker L, 2005).

A. Caspasas

Las caspasas (*cisteín-aspartil proteasas*) son proteasas intracelulares que propagan la muerte celular, la proliferación e inflamación. Una vez activadas las caspasas, por un estímulo específico activan la proteólisis de sus sustratos para provocar una serie de eventos que culminan en la respuesta biológica deseada.

Las caspasas son enzimas con residuos de cisteína en su sitio catalítico, que reconocen y cortan sus sustratos después de un residuo de ácido aspártico. Éstas son sintetizadas como zimógenos y constan de un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Las caspasas se clasifican de acuerdo a su actividad inflamatoria o apoptótica.

Las caspasas apoptóticas a su vez se clasifican en:

- Iniciadoras: caspasa-8, caspasa-10, caspasa-9 y caspasa-2.
- Efectoras: caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7.

Las caspasas inflamatorias son: caspasa-1, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-11, caspasa-12, caspasa-13 y caspasa-14. Está descrito que las primeras 3 inducen paraptosis, un tipo de muerte celular asociado a la activación masiva de células sintetizadoras de citocinas inflamatorias.

Las caspasas ejecutoras poseen prodominios cortos, mientras que las caspasas iniciadoras y las pro-inflamatorias poseen prodominios largos, en los cuales se encuentran dominios efectores de muerte (DED) y dominios de reclutamiento de caspasas (CARD). Ambos dominios pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte (DD). Estas estructuras permiten las interacciones entre las moléculas adaptadoras y las procaspasas, para que estas últimas se escindan y puedan activarse (Lavrik I, 2005).

B. Etapas de la apoptosis

El proceso apoptótico puede dividirse en tres etapas: la iniciación, ejecución y eliminación

- **Iniciación:** existen dos alternativas para comenzar un proceso apoptótico. La primera, que inicia por receptores de muerte en la superficie celular, es conocida como vía extrínseca. La segunda, mediada por mitocondria, es conocida como la vía intrínseca (Figura 1). En ambas vías se activa una cadena de señalización mediada por caspasas que causa la serie de cambios morfológicos descritos anteriormente y finalmente la muerte celular. Los receptores de muerte son parte de los receptores de la superfamilia TNF, los cuales son activados por sus ligandos naturales, la

familia TNF. Cuando los ligandos se unen a sus respectivos receptores de muerte como CD95, TRAIL-R1 y TRAIL-R2, estos receptores activados atraen a la proteína FADD. Después de esta señal, las caspasas 8 y 10 son reclutadas a este complejo de señalización de inducción de muerte. Cuando la concentración de caspasa 8 es adecuada, se inicia la apoptosis, si no es adecuada, entonces la mitocondria interviene para amplificar la señal por la vía intrínseca de apoptosis. La activación de la vía intrínseca, ocurrida en la mitocondria, es mediada por la familia Bcl-2, específicamente por la proteína BID, escindida por caspasa 8, que una vez activada, penetra la membrana mitocondrial. La apoptosis a nivel mitocondrial es inducida por estimulación de la membrana mitocondrial y procede por medio de la liberación de citocromo C y otros factores apoptogénicos al citosol. El citocromo C forma un complejo con APAF1 (*apoptotic protease activating factor-1*), ATP y procaspasa-9; con este complejo conocido como apoptosoma se activa la caspasa-9 (Ouyang L, 2012).

- Ejecución: una vez que las caspasas iniciadoras se unen a sus sustratos, se activan las caspasas ejecutoras caspasa -3, caspasa-6 y caspasa-7. Estas enzimas activas amplifican la cascada proteolítica de las caspasas. Por ejemplo, la escisión de la proteína ICAD, provoca la liberación de la endonucleasa que atraviesa el núcleo para fragmentar el DNA. La escisión de las proteínas actina, plectina, ROCK-1 y gelsolina provoca la fragmentación de la célula, el fenómeno de *blebbing* y la formación de cuerpos apoptóticos.

- Eliminación: en la membrana celular después del fenómeno de exteriorización de fosfatidilserina y moléculas glucosídicas que “marcan” los cuerpos apoptóticos, los macrófagos reconocen estas señales y los fagocitan (Schulze-Bergkamen H, 2004).

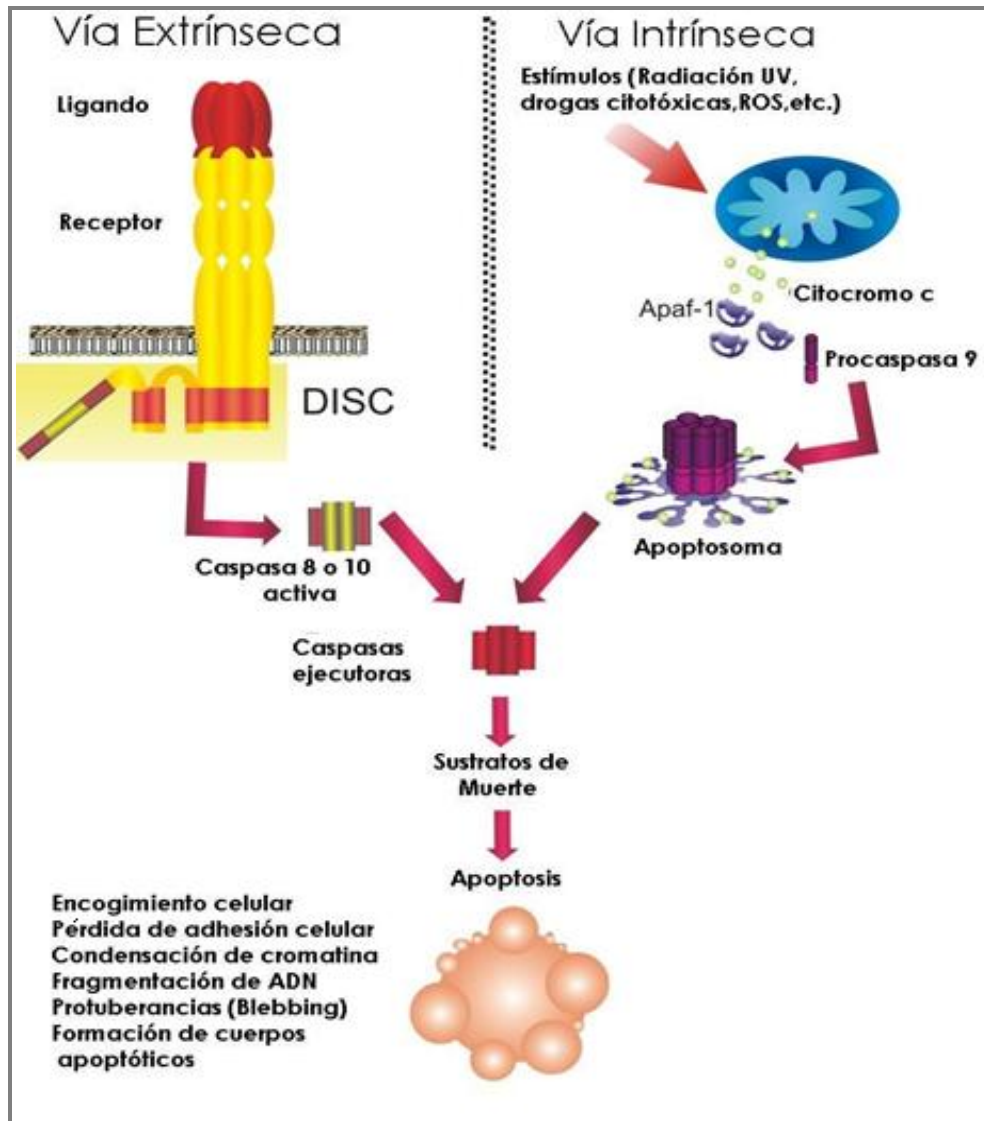


Figura 1. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. (López-González JS, 2008).

C. Regulación de la apoptosis

Existen diferentes familias de proteínas que regulan el proceso apoptótico en las células:

- Las proteínas FLIPs [*FADD-like interleukine-1 β -converting enzyme like protease (FLICE/ caspase-8) inhibitory proteins*] interfieren en la iniciación de la apoptosis directamente a nivel de los receptores de muerte. Estas proteínas y sus variantes (largas y cortas en humanos) tienen una estructura homóloga a la caspasa-8, pero carecen de su sitio catalítico, lo que les permite unirse al complejo de inducción a la muerte DISC (*death-inducing signaling complex*), sin desencadenar las actividades proteolíticas de las caspasas (Schulze-Bergkamen, 2004).
- Los miembros de la familia Bcl-2 que regulan la apoptosis a nivel mitocondrial pueden ser divididos o clasificados de acuerdo a su función pro-apoptótica (Bax, Bak y Bid) o anti-apoptótica (Bcl-2 y Bcl-xL). Estas proteínas tienen influencia en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Cotter T, 2008).
- Las IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis) se unen a las caspasas evitando su actividad. También pueden actuar como ligasas de ubiquitina promoviendo la degradación de las caspasas a las que se unen. Existen 9 tipos de IAPs, sin embargo, no todas tienen actividad inhibitoria de caspasas. Estas proteínas inhibidoras a su vez tienen una proteína inhibidora llamada SMAC/DIABLO (*second mitochondria – derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI*), la cual es liberada de la

mitocondria con el citocromo C durante la activación de la apoptosis y promueve la activación de las caspasas inhibiendo a las IAPs (Hunter A, 2007).

Además de las proteínas reguladoras de caspasas, también se regula la apoptosis a nivel genético. Por ejemplo, la vía de señalización PI3K/AKT contribuye a la resistencia de la apoptosis. PI3K (fosfoinositol 3 cinasa) es activada por señales de supervivencia como factores de crecimiento. Una vez activada esta proteína, se genera al lípido fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PtdIns(3,4,5)P₃] desencadenando el reclutamiento de PDK1 y PDK2 (cinasa PtdInsP₃-dependiente 1 y 2) y Akt (proteína cinasa B) a la membrana celular. En el complejo formado, PDK1 y PDK2 activan a Akt por fosforilación. La activación de Akt induce fuertes señales de supervivencia como la inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad. Otro gen determinante en la regulación apoptótica es el TP53 que codifica la proteína p53. Una de las funciones de esta proteína es regular la expresión de varias proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas a nivel transcripcional y post-transcripcional. A su vez, existen proteínas que regulan la actividad de p53 como ASPP (del Inglés *Apoptosis Stimulating Protein of p53*), que es un potente activador de esta proteína. Al contrario de ASPP, la proteína codificada por el gen MIF, inhibe la expresión de p-53 y por lo tanto, la apoptosis. Otro regulador genético de la apoptosis es el factor nuclear B (NF- κ B) cuya activación inhibe la apoptosis por medio de la transcripción de genes importantes en la señalización de apoptosis como c-FLIP, cIAP1 y cIAP2, además de miembros de la familia Bcl-2 como A1/BFL1 y Bcl-xL (Schulze, 2004).

D. Apoptosis y cáncer

En promedio un cuerpo humano adulto genera aproximadamente 60 billones de células al día, como consecuencia, un número igual de células debe morir por apoptosis para mantener la homeostasis celular. Por lo tanto, la desregulación del proceso apoptótico provoca una acumulación anormal de células que contribuye al desarrollo de tumores. La resistencia de células tumorales a la apoptosis es un requisito para el desarrollo del cáncer (Portt L, 2011).

La falta de regulación de proliferación por sí misma no es suficiente para la formación del tumor, porque este fenómeno provocaría muerte celular, pues la sobreexpresión de promotores del crecimiento como c-MYC, E1A o E2F1 sensibiliza las células para desencadenar apoptosis. Es decir, además de la sobreexpresión de proteínas que promueven la proliferación, para el desarrollo de tejido neoplásico se necesita alta expresión de proteínas anti-apoptóticas y/o baja expresión de proteínas pro-apoptóticas (Ghobrial I, 2005).

2) Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad que se caracteriza por una división acelerada y descontrolada de células modificadas genéticamente y/o epigenéticamente, que dan origen a tejido neoplásico en el pulmón que adquiere la habilidad de invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis (*National Cancer Institute*, 2012).

A. Origen molecular

Las células cancerígenas difieren de las células normales del tejido de origen en el control del crecimiento celular, su morfología, las interacciones entre células, propiedades de adhesión, las propiedades de membrana, la estructura del citoesqueleto, la secreción de proteínas y la expresión génica. Todos estos cambios surgen de mutaciones acumuladas por la alta tasa de división celular, provocada por las primeras mutaciones en proto-oncogenes, genes supresores y genes de reparación de ADN. Los proto-oncogenes son genes cuya mutación o cambio epigenético tiene efectos de ganancia de función, es decir, la expresión de estos genes induce el comportamiento maligno en la célula transformada; mientras que la modificación de los genes supresores provoca la pérdida de función. Los genes supresores generalmente son reguladores negativos de la proliferación celular (Schulze, 2005).

B. Causas

El cáncer inicia primero en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifactorial y es el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente, su estado físico y tres categorías de agentes externos que pueden alterar el DNA de esta primera célula:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes
- Carcinógenos químicos, como los asbestos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, benceno, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas y el arsénico entre otros.

- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus como el del hepatitis B y C, y el virus del papiloma humano.

C. Epidemiología

En 2012, 14.1 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer en todo el mundo, de las cuales el 13% corresponde a cáncer de pulmón ocupando el primer lugar de enfermedades neoplásicas. 1.59 millones de personas murieron a causa de cáncer de pulmón correspondiente al 19% de casos, siendo también la primera causa de defunciones por cáncer según la OMS.

En 2010 el INEGI reportó 74,685 (13%) por cáncer, de las cuales 6,796 (9%) son por cáncer pulmonar, ubicándose en el primer lugar en nuestro país, siendo 68% de estas muertes entre el género masculino. La tasa de mortalidad de este tipo de cáncer es de 60.33 por cada 100 mil habitantes. El índice de fatalidad es de 0.96, es decir, casi el 100% de los pacientes muere a causa de este padecimiento al año.

Las muertes por cáncer de pulmón varían en cada país según el hábito que tienen sus habitantes de fumar, ya que el 90% de las personas que lo padecen, tuvieron el hábito de fumar en algún momento de su vida. El tabaco tiene más de 5000 componentes detectados de los cuales 98 pueden ser cancerígenos.

D. Clasificación de cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se puede clasificar de acuerdo a estudios citológicos y biopsias en carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Brambilla E, 2001).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (del Inglés *Non-small cell lung cancer* (NSCLC)) es el tipo más común de cáncer de pulmón y conforma el 87% de todos los tumores de pulmón. Existen tres clases de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

- El Adenocarcinoma conforma el 40% de todos los NSCLC. Este tipo de cáncer se encuentra generalmente en las regiones más externas del pulmón. También existe una forma rara de adenocarcinoma, llamado carcinoma broncoalveolar (Bronchioalveolar Carcinoma (BAC)) que se está observando con mayor frecuencia a nivel mundial. BAC se disemina a lo largo de todo el pulmón a diferencia de otros tipos de cáncer de pulmón más comunes que forman tumores únicos. Se desconoce la causa del BAC. A pesar de presentarse en personas que fuman, generalmente se da en aquellas que nunca han fumado.
- El Carcinoma de Células Escamosas conforma del 25 al 30% de NSCLC. Este tipo es generalmente encontrado cerca de los bronquios, hacia el centro de la cavidad torácica. Es también conocido como carcinoma epidermoide y está usualmente asociado a la exposición al humo de tabaco.

- El Carcinoma de Células Gigantes conforma del 10% al 15% de NSCLC. Es de crecimiento rápido y puede aparecer en cualquier parte del pulmón.

El cáncer de pulmón de células pequeñas (del Inglés *Small Cell Lung Cancer*, SCLC) tiende a crecer y diseminarse más rápido y puede causar síntomas más pronto que el cáncer de células no pequeñas.

3) Cumarinas

Las cumarinas son moléculas bicíclicas con propiedades aromáticas que son metabolitos secundarios muy comunes en plantas. Se han aislado cumarinas de 800 especies de plantas y microorganismos y se han reportado más de 1000 compuestos derivados. Muchas moléculas clasificadas como cumarinas se caracterizan por tener efecto biológico. A las cumarinas se les atribuyen propiedades antineoplásicas, antibióticas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, antipsicóticas, anticoagulantes y antioxidantes (Asiri A.M., 2003) (Olomola TO, 2013). Son un grupo de compuestos que tienen un papel importante como aditivos en la industria alimenticia. Por sus propiedades antioxidantes, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética se utiliza como fijador y potenciador en perfumes, jabones y detergentes. Por sus propiedades fluorescentes también son utilizados como marcadores de fluorescencia para análisis, tinciones y en clínica.

La estructura básica de las cumarinas está compuesta por un anillo bencénico y un anillo heterocíclico de α -pirona (Figura 2).

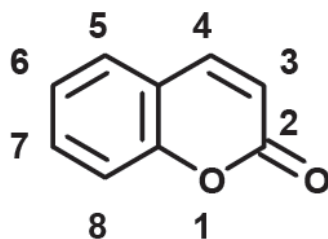


Figura 2. Estructura de la cumarina enumerando los posibles sustituyentes.

Se estima que la máxima exposición diaria a la cumarina simple derivado de alimentos en un individuo es de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y de 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ derivado de productos cosméticos. Una persona de 60 Kg consumiría 3.6 mg por día. No se han observado efectos adversos a la cumarina con un consumo 100 veces superior al derivado de alimentos, es decir, 120 mg por día. (Lake BG, 1999).

La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional Estadounidense considera que la cumarina no se debe clasificar como cancerígena para humanos y no se han reportado intoxicaciones por el consumo de esta molécula.

En el humano la vía principal de metabolización es la hidroxilación en el carbono 7 catalizada por la enzima CYP2A6 del citocromo P450 (Figura 3). La 7-hidroxycumarina se excreta en la orina como glucurónido y su tiempo de vida media en la circulación es de 1.5 horas y el 80% del fármaco es excretado por vía renal (Hassanzadeh M, 2013). La mayor actividad antiproliferativa de la cumarina es atribuible a este metabolito principal (Elinos-Báez, 2005).

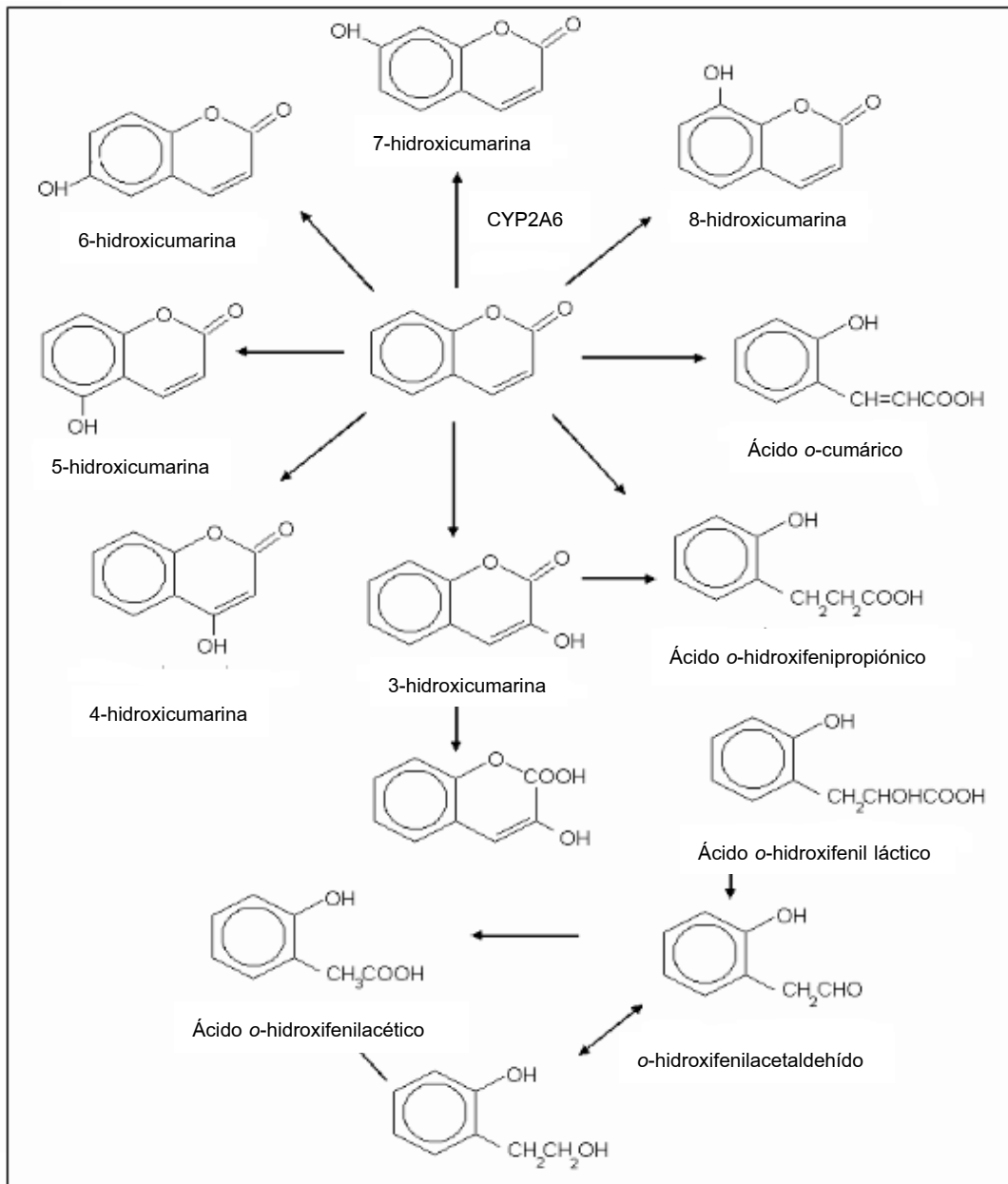


Figura 3. Vías metabólicas de la cumarina (modificada de Thornes, 1997).

A. Cumarinas y cáncer de pulmón

Se han descrito propiedades citostáticas y apoptóticas de algunas cumarinas simples (cumarina y la 7-hidroxycumarina) en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 y se ha determinado el mecanismo de acción para este evento, que consiste en la disminución de la ciclina D1, sin afectar la cantidad de su RNAm y la inducción de apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 (Jiménez-Orozco FA, 2001).

En estudios previos, hemos encontrado que la 7-hidroxycumarina *in vitro* induce un efecto apoptótico en las células de A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano, estimado mediante los cambios morfológicos característicos de la apoptosis, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, incrementando la actividad enzimática de la caspasa 3, estimada por ensayos colorimétricos empleando sustratos e inhibidores específicos de esta enzima (Soto, 2008).

En estudios anteriores se han realizado ensayos en ratones con este tipo de cáncer y en líneas celulares tratadas con la cumarina y sus derivados simples en los cuales se demuestra la existencia de actividad citostática y citotóxica:

- Zacharaski *et al.* en 1981 reportaron en un estudio de pacientes control con carcinoma de pulmón de células pequeñas tratados con una combinación de quimioterapia más radioterapia, donde la mediana en la supervivencia de este grupo (25 semanas) se duplicaba si se agregaba al tratamiento la warfarina.

- Marshall en 1994, reportó los efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares tumorales humanas por la cumarina y la 7-hidroxicumarina con concentraciones de 250-300 µg/mL, incluyendo la línea A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.
- Kawaii en 2001 encontró que la CI50 de la cumarina en las células A-549 es mayor a 400 µM.
- Jiménez-Orozco *et al*, en 2001 reportaron que en las células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas por 72 horas, la CI50 de la cumarina fue de 257 µg/mL y la de 7-hidroxicumarina de 100 µg/mL. Estos compuestos inhiben la transición de la fase G1/S del ciclo celular a 160µg/mL (1mM) y describió el mecanismo de acción: la disminución de ciclina D1, sin afectar su ARNm, por lo que se sugirió que la disminución de esta ciclina es post- transcripcional.
- López González *et al.* en 2004 reportaron la concentración (160 µg/mL) en la cual la cumarina y la 7-hidroxicumarina inducía apoptosis después de 24 horas de tratamiento en células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano.
- Musa *et al.* en 2012 reportaron la disminución de crecimiento tumoral en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano midiendo la disminución de la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de Bax.

4) Microinyección

La introducción de cDNA's exógenos, proteínas, péptidos y fármacos en el citoplasma o núcleo celular es un procedimiento ampliamente utilizado en la biología celular y molecular, para lo cual se han desarrollado una variedad de técnicas (Zhang Y, Yu LC, 2012):

- Biológicas: mediados por virus o proteína acarreadora.
- Químicas: difusión pasiva, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, liposomas.
- Físicas: electroporación, nucleofección, vibración molecular, vibraciones ultrasónicas, biolística y microinyección.

La microinyección es una técnica de introducción de sustancias exógenas como: proteínas, péptidos, cDNA's, fármacos, espermatozoides directamente en el núcleo o en el citoplasma de las células penetrando la membrana celular y/o nuclear con micropuntas. Entre sus aplicaciones están la producción de animales transgénicos, estudio de embriones humanos, fertilización *in vitro*, estudio de proteínas reguladoras de transcripción viral, clonación, estudio de procesos biológicos (Zhang Y, 2012).

Utilizar la microinyección como método de introducción de sustancias exógenas tiene ciertas ventajas sobre los otros métodos de transfección. Por ejemplo, la sustancia inyectada es el único factor que afecta a las células, es decir, que esta sustancia será la única causa del cambio o actividad que se busca en la célula. Otra ventaja de la microinyección es la baja toxicidad en comparación de otros métodos químicos e infecciones virales que afectan la viabilidad de las células. Su

eficiencia es del 80-100% una vez que se está entrenado en la técnica, lo cual es superior a la introducción de sustancias por los otros métodos, en parte porque el índice de mortalidad de las células es bajo. Además de la alta eficiencia de este método, se consume poco tiempo en realizarlo y se puede controlar de manera exacta y precisa el volumen y la cantidad de sustancia a microinyectar. Una ventaja más de esta técnica es que la microinyección es localizada, es decir, se puede inyectar en el núcleo o en el citoplasma (Zhang Y, 2008).

Aún cuando el uso de la microinyección sea conveniente para estudios en células, existen ciertas desventajas que son importantes considerar al realizar un ensayo de microinyección, ya que ésta es una técnica especializada y por lo tanto, se necesita de un equipo costoso y de personal especializado que esté capacitado para usarlo. Si se trabaja con células con alta tasa de división, con el paso de los días, esta sustancia se verá “diluida”, ya no estará a la misma concentración que se inyectó. Otra desventaja de la microinyección es que se introduce material en una única célula, por lo tanto esta técnica no es práctica para transfección masiva de células (Zhang Y, 2008).

A. Micropuntas

Las micropuntas de microinyección se elaboran a partir de capilares de vidrio con un equipo especializado llamado estirador, para que su forma y diámetro sea adecuada y repetible. Estos capilares de vidrio se colocan en una cámara rodeados al centro por un filamento metálico que se somete a calentamiento eléctrico. Después una fuerza lineal y horizontal, jala los extremos del capilar para

crear 2 micropuntas. Al final del estiramiento, se expulsa un gas con determinada presión (generalmente nitrógeno o aire comprimido), verticalmente desde abajo del filamento metálico con el objetivo de romper el vidrio. Por lo tanto, la fuerza de estiramiento, la velocidad de estiramiento, la temperatura de calentamiento y el tiempo de expulsión del gas son los parámetros críticos para determinar la forma y el diámetro de la micropunta (Zhang Y,2007).

5) Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual una molécula absorbe un fotón de alta energía, sufre una excitación electrónica y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía, después estos electrones excitados decaen nuevamente a orbitales de menor energía emitiendo luz de onda en el proceso.

Las moléculas que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación se denominan fluorocromos.

En este trabajo de tesis se introdujo a las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano el sustrato específico de caspasa 3, acoplado a un fluorocromo por medio de la técnica de microinyección. Este fluorocromo es rodamina 110, cuyo máximo de longitud de onda de excitación y emisión son 496 nm y 520 nm respectivamente cuando se encuentra libre. De los dos grupos amino de la molécula de rodamina 110 se encuentran unidos los péptidos bis-(N-CBZ-L-aspartil-glutamil-L-valil-L-aspartil), que son reconocidos y escindidos de manera

específica por la caspasa 3, liberando así a la molécula de rodamina 110 que emite fluorescencia verde como se ejemplifica en la Figura 4.

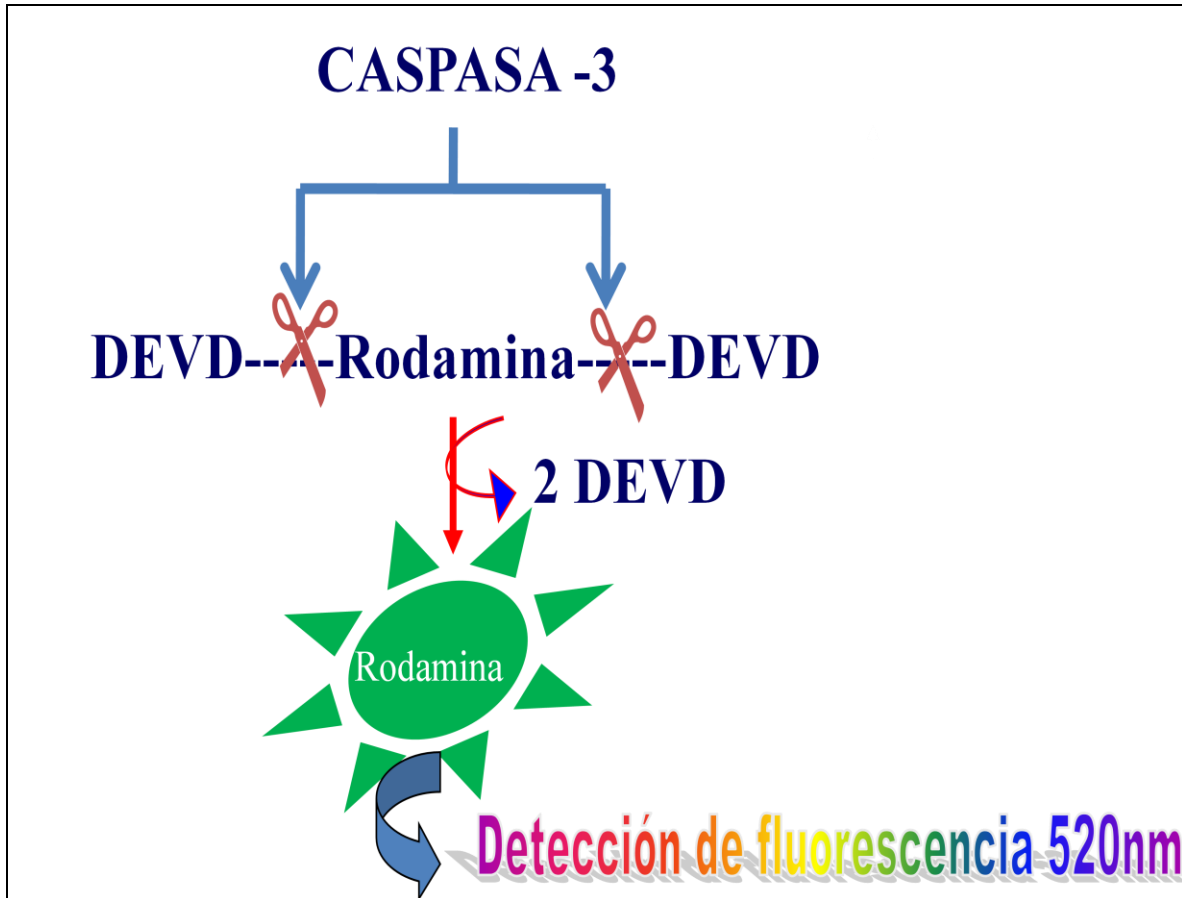


Figura 4. La caspasa 3 reconoce de manera específica el péptido DEVD y rompe su unión con la rodamina 110 que es el fluorocromo que se detecta a 520 nm. La señal fluorescente de la rodamina 110 es directamente proporcional a la actividad de la caspasa 3.

IV. PRODECIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Línea celular

A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD).

2. Equipo

- Cámara digital *Nikon Digital Camara DXM1200c*.
- Campana de flujo laminar *Nuair Class II A NU-425-400 SERIES 30*.
- Centrífuga SIGMA 2-16 (*Shropshire, Reino Unido*).
- Estirador de capilares *Sutter Instrument CO Modelo P-87*.
- Horno *Grieve Laboratory LR-271C*.
- Incubadora *Nuair NU-4750 Series 1* con chaqueta de agua e inyección automática de CO₂.
- Lámpara de fluorescencia *Nikon*.
- Microfuga *Heraeus Biofuge* pico.
- Microinyector *Narishige IM300*.
- Micromanipulador *Narishige MHW-3*.
- Microscopio invertido *Nikon Eclipse TS100*.

3. Material

- Cámara de Neubauer mejorada (*Reichert*) de 1 mm de profundidad.
- Cajas Petri 3.5 cm

- Capilares de borosilicato con microfilamento (*World Precision Instruments*)
- *Microloaders Eppendorf pippette tip.*
- Micropipetas y puntas *Eppendorf* de 0.5-10 μL , 2-20 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL .

4. Reactivos

- 7-hidroxicumarina (*Aldrich* 99% de pureza).

Se preparó una solución de 10mg/mL de 7-hidroxicumarina en etanol.

- Amortiguador de fosfatos (PBS pH 7 ± 0.2).
- Etanol 70%.
- HCl(*J.T. Baker*).

- Marcadores de microinyección:

- a. Dextrán fluoresceína (*Molecular Probes 3000MW*).

Se preparó una disolución de 0.1% con PBS.

- b. Rojo de Texas (*Molecular Probes 3000 MW*).

Se preparó una disolución de Rojo de Texas en PBS de 1mg/mL.

- Medio de cultivo RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*).
- Penicilina- estreptomycin (*Sigma-Aldrich*).
- Suero Fetal Bovino (*Hyclon Thermo Scientific*).
- Sustrato de caspasa- 3.

Z-DEVD-R110 (*Gibco Invitrogen*) Se preparó una disolución de 2mg/mL en PBS.

- Tripsina/EDTA 0.25% (*Gibco 25200*).

5. Software

- *NIS-Elements Ar V 2.3*
- *SigmaStatV 3.5*
- *SigmaPlot V 11.0*

6. Procedimientos

A. Cultivo celular

La línea celular A-549 (ATCC) de adenocarcinoma pulmonar humano fue cultivada con medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal y 100 U/mL de penicilina- estreptomycin. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Estas células presentan características adhesivas y cuando su densidad celular fue tal, que forma una monocapa en la caja de cultivo, se trataron con una solución de tripsina-EDTA 0.25% para desprenderlas. Después se cuantificaron con cámara de Neubauer y se resembraron aproximadamente 200,000 células en las cajas de cultivo o en cajas Petri de 3.5 cm para los ensayos de microinyección.

B. Elaboración de micropuntas

Para la elaboración de micropuntas se utilizaron capilares de borosilicato. Antes de someterlas al estiramiento, los capilares se lavaron 24 horas con HCl 0.5N y posteriormente 24 horas más con etanol al 70%. Finalmente éstos se enjuagaron 4 veces con agua destilada y se secaron en horno por 3 horas a 180°C.

Las micropuntas fueron elaboradas en el estirador *Sutter Instrument*, al cual se le introdujeron los parámetros adecuados para obtener micropuntas de aproximadamente 0.2 μm de diámetro y una forma alargada. Dichos parámetros equipo son: *HEAT* (temperatura de fundición del vidrio); *P* (presión del aire durante la fase de enfriamiento); *Pull* (fuerza del estirador); *VEL* (velocidad de estiramiento determinado por la viscosidad del vidrio); *TIME* (tiempo de enfriamiento).

C. Determinación de tiempo y presión de microinyección

- a. Primero se elaboraron 6 micropuntas de microinyección en el estirador de capilares *Sutter*.
- b. Se preparó la solución de microinyección: Dextrán fluoresceína 0.1% para la determinación de los parámetros de presión y tiempo de microinyección en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.
- c. Se retiró el medio de cultivo de la caja Petri, se lavó con amortiguador de fosfatos y se vertió 1 mL del amortiguador PBS.
- d. Después se transfirió la solución de microinyección a la micropunta con un microcargador.
- e. Se montó la punta de inyección en el *holder* del micromanipulador.
- f. Posteriormente se ajustaron los parámetros de microinyección.
 - Tiempo de inyección: se determinó midiendo la duración de fluorescencia de 200 a 400 ms.

- La presión de microinyección: a partir de 2 psi con aumentos de 0.5 psi por cada microinyección hasta observar la mayor duración de fluorescencia.
- g. Se posicionó la aguja con ayuda del micromanipulador a 45° de la base de la caja Petri.
 - h. Se colocó la punta sobre la superficie de una célula utilizando el micromanipulador.
 - i. Se desplazó la punta de la aguja hasta penetrar la membrana celular con un movimiento micrométrico proporcionado por el micromanipulador.
 - j. Se presionó el botón “*inject*”.
 - k. Se capturaron y almacenaron las microfotografías obtenidas con el software *NIS-Elements Ar 3.2*.

D. Tratamiento de células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 con 7-hidroxycumarina

Se sembraron células A-549 en cajas Petri de 3.5cm y se incubaron 24hrs hasta que estas se adhirieron en la base de la caja Petri. Se preparó 1mL de medio de cultivo con suero fetal bovino con una concentración de 300µg/mL de 7-hidroxycumarina y se vertió en la caja Petri con las células A-549.

E. Microinyección de células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 expuestas a 7-hidroxycumarina o a su disolvente.

- a. Se incubaron las células A-549 expuestas a 300 µg/mL de 7-hidroxycumarina o a su disolvente (etanol 70%) durante 3, 6, 12, 18 y 24 hrs a 37°C con una atmósfera 5% de CO₂.
- b. Se preparó la solución de microinyección:

Sustrato de caspasa-3 Z-DEVD-R110 (1.3 mg/mL) y Rojo de Texas (0.3 mg/mL) para los ensayos de determinación de la activación de caspasa-3.
- c. Se retiró el medio de cultivo con el tratamiento de 7-OHC o etanol, de la caja Petri y se lavaron las células con 1 mL de PBS estéril.
- d. Se vertió 1 mL de PBS estéril en la caja Petri
- e. Se transfirió la solución de microinyección a la micropunta con un microcargador
- f. Se introdujeron los parámetros de tiempo y presión de microinyección.
- g. Se microinyectaron de 3 a 5 células por ensayo repitiendo los puntos *g-k* del procedimiento anterior.

7. Análisis de Imágenes

Se analizaron las microfotografías de las células microinyectadas capturadas con el *Software NIS-Elements Ar 3.2* midiendo la intensidad de fluorescencia verde por pixel en el área correspondiente a las células microinyectadas.

Se graficaron las intensidades de fluorescencia verde por pixel contra los tiempos post-inyección para realizar los cursos temporales correspondientes a los diferentes tiempos de exposición de las células A-549 al compuesto cumarínico y su disolvente (*Sigma Plot V 11.0*).

8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo de células estudiadas (prueba de Kruskal-Wallis). En los casos en que existían diferencias, se procedió a realizar las pruebas apropiadas para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero. Posteriormente se realizó la prueba de T de Student entre el grupo tratado con el etanol y la 7-OHC para cada tiempo estudiado. Finalmente se determinaron las regresiones lineales, se calcularon las pendientes de las velocidades iniciales de los cursos temporales obtenidos de la cinética de la caspasa 3 entre 0 y 60 s y se realizó la prueba de análisis de varianza para determinar si las pendientes eran diferentes de cero (*SigmaStat V 3.5*).

V. RESULTADOS

1. Elaboración de micropuntas

Se probaron diferentes combinaciones de valores para los parámetros del estirador de capilares Sutter P-87 con la finalidad de encontrar los adecuados para elaborar micropuntas de diámetro aproximado de 0.2 μm y forma alargada.

Tabla I. PARÁMETROS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MICROPUNTAS.

Parámetros	Valores
<i>HEAT</i>	550
P	500
<i>Pull</i>	80
<i>VEL</i>	10
<i>TIME</i>	80

2. Determinación de los parámetros de microinyección

Con el objetivo de encontrar el tiempo y presión de microinyección para realizar los ensayos en las células A-549, se probaron tiempos de microinyección de 200 a 400 ms; y la presión de microinyección a partir de 2 psi con aumentos de 0.5 psi por cada microinyección hasta observar la mayor duración de fluorescencia verde utilizando como marcador dextrán fluoresceína.

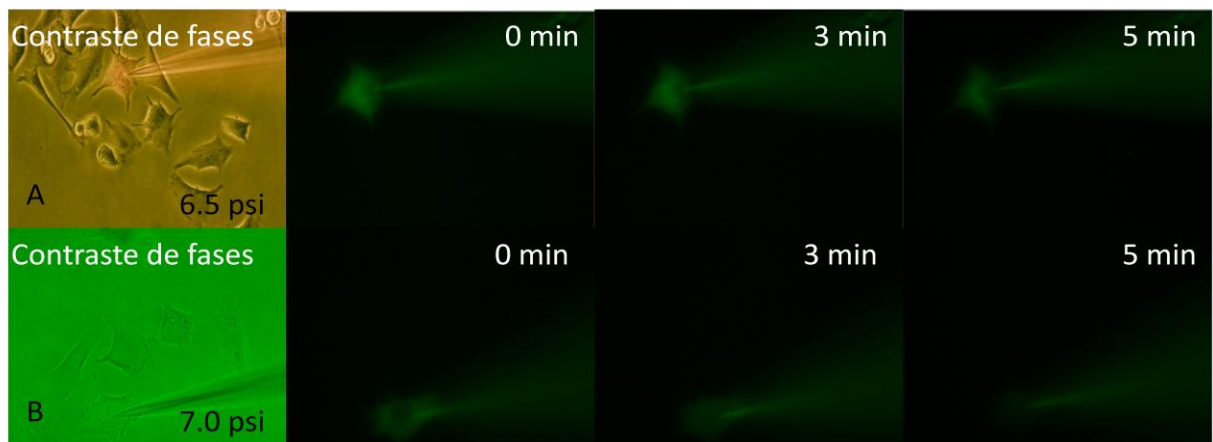


Figura 6. Variación de la presión ejercida para la microinyección con tiempo de microinyección de 400ms. A. Microinyección con presión de 6.5 psi. B. Microinyección con presión de 7.0 psi. Imagen 40X.

La presión de microinyección de 6.5 psi es adecuada para la detección del marcador por microfotografía de epifluorescencia ya que después de 5 minutos la célula sigue siendo viable. La presión de 7.0 psi resultó ser excesiva, ya que la membrana celular se rompe y el marcador de fluorescencia se difunde.

3. Cinética de la actividad de caspasa 3 con microinyección en célula única

A. Cinética de activación de caspasa 3 sin exposición a 7-hidroxycumarina

Para determinar la actividad basal de la caspasa 3, es decir, sin inducción provocada por la 7-hidroxycumarina en las células A-549, se microinyectó el sustrato de caspasa-3 DEVD-R110 combinado con Rojo de Texas, este último con la finalidad de comprobar que la solución de microinyección se introdujo a la célula. Se tomaron microfotografías con el software Nis Elements Ar 3.2 para observar la fluorescencia verde emitida por el fluorocromo rodamina 110.

La célula positiva a la tinción con Rojo de Texas indica que la célula fue microinyectada correctamente. La ausencia de fluorescencia verde emitida por rodamina 110 indica la no activación de caspasa 3 en ausencia del tratamiento con la 7-OHC (Figura 7).

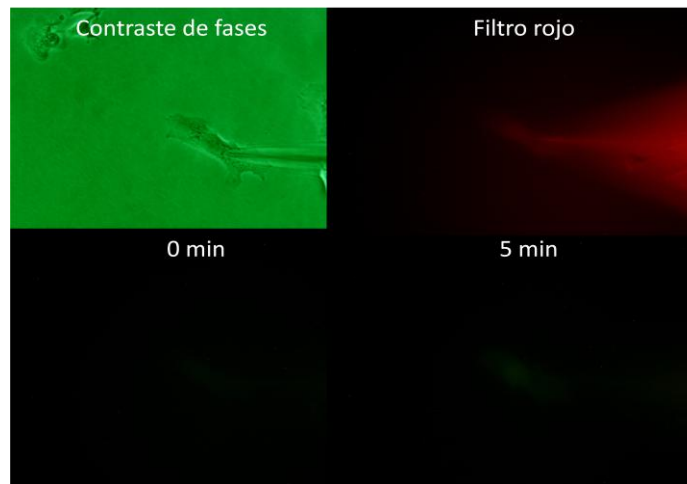


Figura 7. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 sin exposición a 7-OHC. A) Contraste de Fase de la célula inyectada. B) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615nm) C-D) Ausencia de fluorescencia verde por rodamina110 (520nm). Imagen 40X.

B. Cinética de activación de caspasa 3 por la exposición a 7-hidroxicumarina

Con la finalidad de determinar la actividad de la caspasa 3, inducida por la 7-hidroxicumarina en las células A-549, se expusieron las células al fármaco por 3, 6, 12, 18 y 24 hrs. Después se microinyectó el sustrato de caspasa-3 DEVD-R110 combinado con Rojo de Texas. Se tomaron microfotografías con el software Nis Elements Ar 3.2 para observar y cuantificar la fluorescencia verde emitida por el fluorocromo rodamina 110. Con estas imágenes se construyeron las gráficas para mostrar los cursos temporales de intensidad de fluorescencia contra tiempo (la fluorescencia verde correspondiente a la actividad de caspasa 3), (Figuras 8-17).

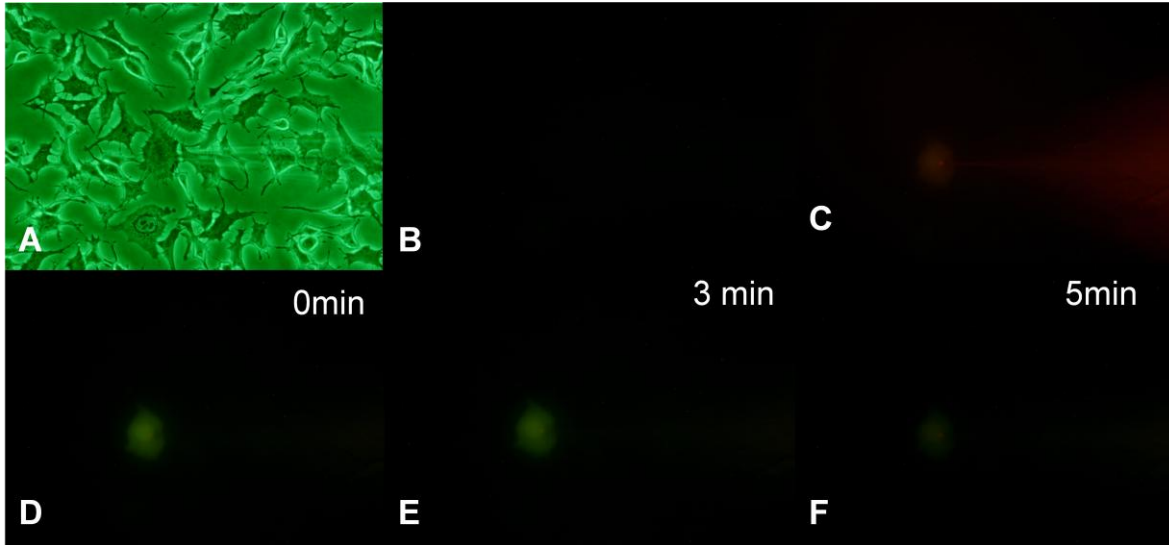


Figura 8. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 tratada con 300 µg/ml de 7-OHC durante 3 hrs. A) Contraste de Fase de la célula antes de la inyección. B) Célula sin fluorescencia antes de la inyección en microscopía de fluorescencia (520 nm) C) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615 nm) D-F) Cambios en la intensidad de fluorescencia de R110 (520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Imagen 40 X.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (3 HR)
EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

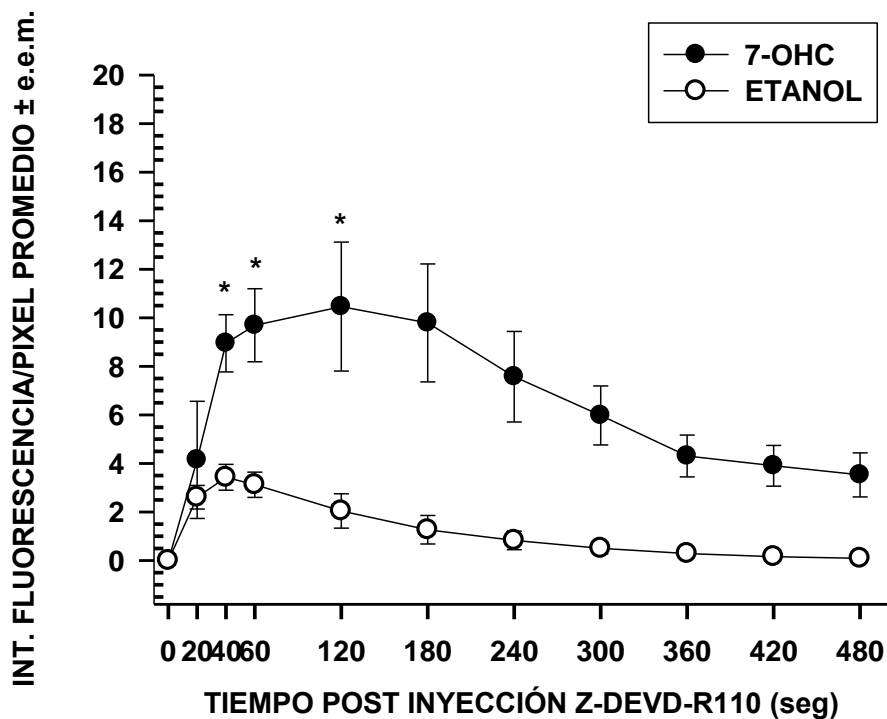


Figura 9.

Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y posteriormente prueba de Tukey y T de Student.

En el caso del curso temporal de la exposición a la 7-hidroxicumarina se realizó análisis de varianza y se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (Kruskal-Wallis). La prueba de Tukey se realizó para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los tiempos 60 s; 120 s; 180 s. Cuando se realizó la comparación mediante prueba de T. de Student entre el grupo tratado con el etanol y la 7-hidroxicumarina solamente se encontró diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) entre los tiempos 40 s, 60 s y 120 s.

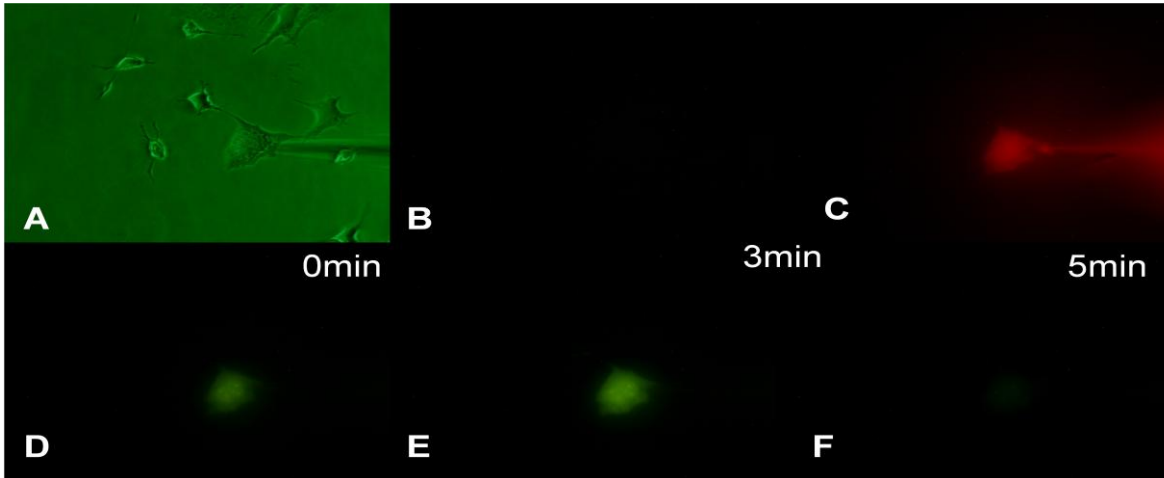


Figura10. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 tratada con 300 $\mu\text{g/ml}$ de 7-OHC durante 6 hrs. A) Contraste de Fase de la célula antes de la inyección. B) Célula sin fluorescencia antes de la inyección en microscopía de fluorescencia (520 nm) C) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615nm) lo que indica que la célula fue microinyectada D-F) Cambios en la intensidad de fluorescencia de R110 (520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Imagen 40 X.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (6 HR)
EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

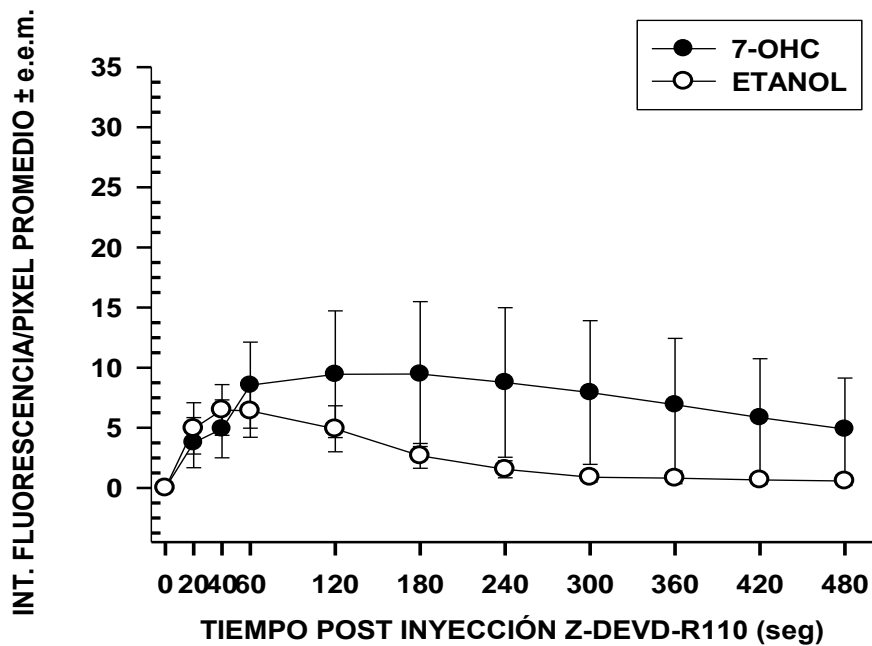


Figura11. Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis), prueba de Mann-Whitney y prueba de *T* de Student.

Para la curva temporal de la exposición a la 7- OHC se realizó análisis de varianza y se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (Kruskal-Wallis). Se procedió a realizar la prueba de Mann-Whitney para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los tiempos 60 s; 120 s; 180 s; 240 s; 300 s; 360 s; 420 s y 480 s. Cuando se realizó la comparación mediante prueba de T de Student entre el grupo tratado con el etanol y la 7-OHC no se observaron diferencias estadísticamente significativas a ninguno de los tiempos estudiados.

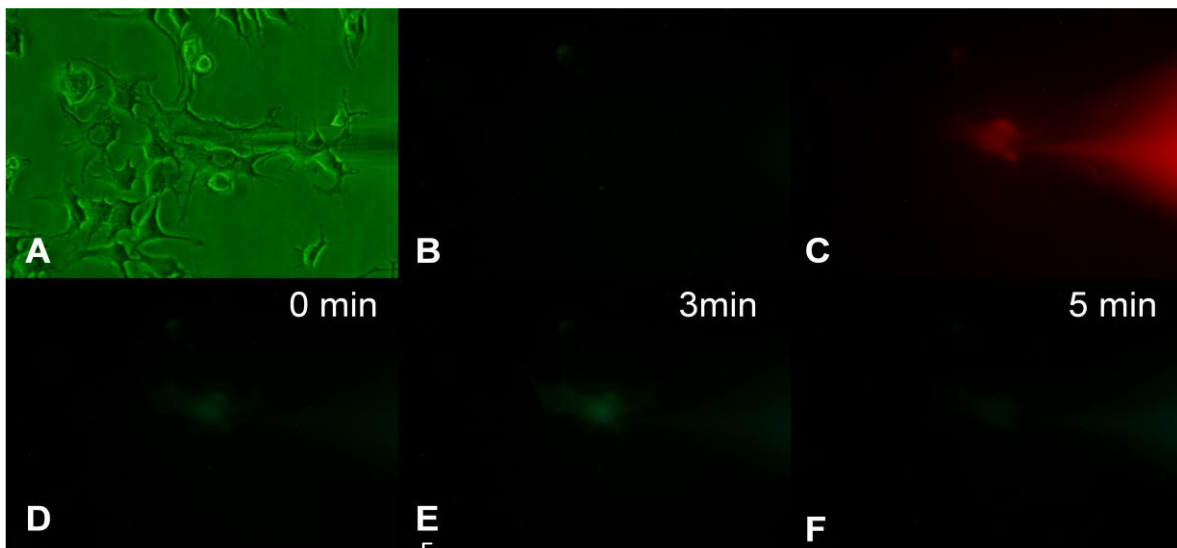


Figura12. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 tratada con 300 µg/ml de 7-OHC durante 12 hrs. A) Contraste de Fase de la célula antes de la inyección. B) Célula sin fluorescencia antes de la inyección en microscopía de fluorescencia (520 nm) C) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615 nm) lo que indica que la célula fue microinyectada D-F) Cambios en la intensidad de fluorescencia de R110 (520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Imagen 40 X.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (12 HR)
EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

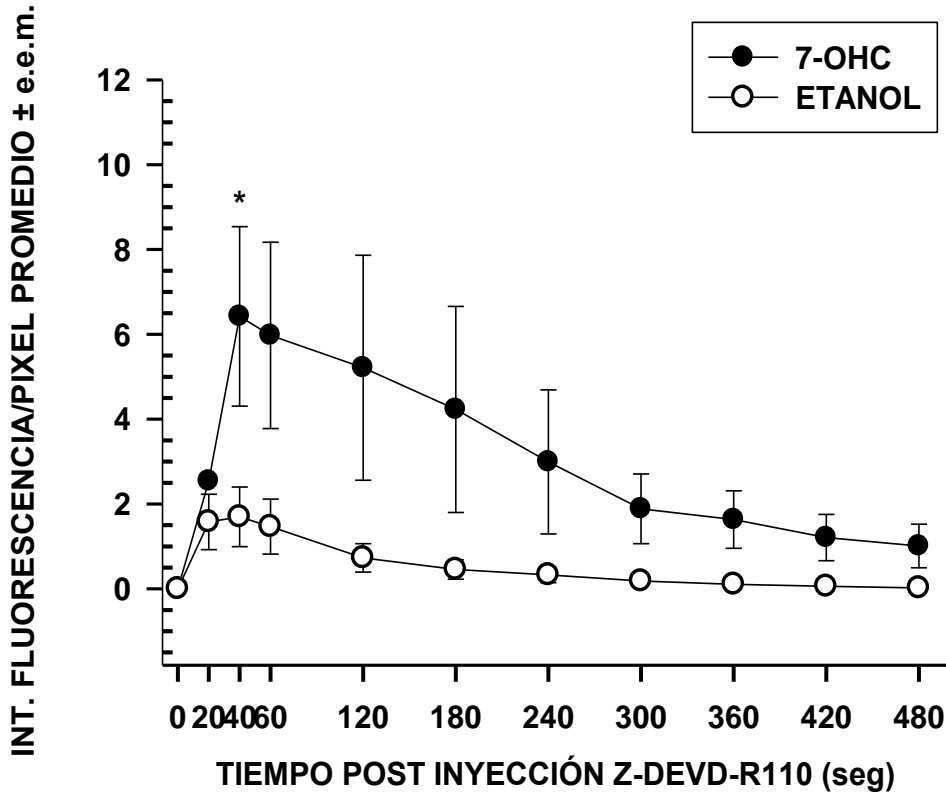


Figura13. Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis), prueba de Dunn's y prueba de *T de Student*.

En el análisis de varianza, realizado para el curso temporal de la exposición a la 7-hidroxycumarina, se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (Kruskal-Wallis). Se procedió a realizar la prueba de Dunn's para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los tiempos 40 s; 60 s y 120 s. Cuando se realizó la comparación mediante prueba de T de Student entre el grupo tratado con el etanol y la 7-hidroxycumarina se observaron diferencias estadísticamente significativa únicamente a los 40 s (* $p < 0.05$).

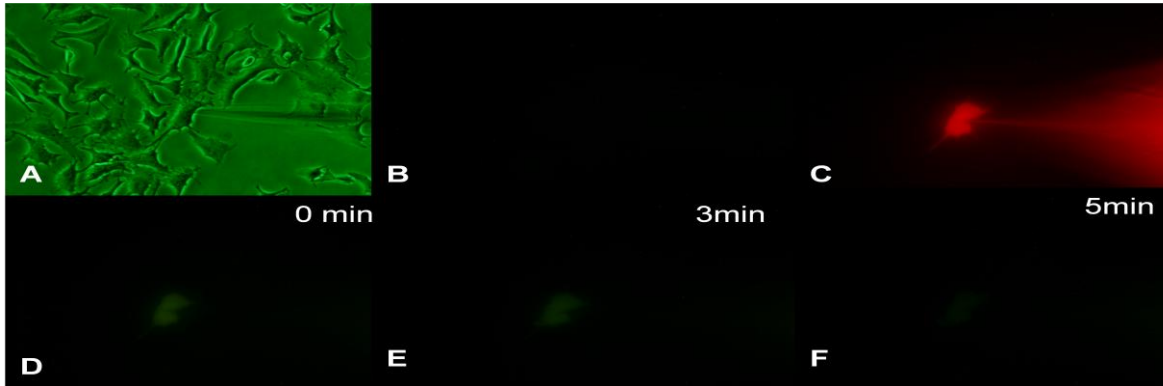


Figura14. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 tratada con 300 µg/ml de 7-OHC durante 18hrs, microinyectada con el sustrato de C3: DEVD-R110. A) Contraste de Fase de la célula antes de la inyección. B) Célula sin fluorescencia antes de la inyección en microscopía de fluorescencia (520 nm) C) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615 nm) lo que indica que la célula fue microinyectada D-F) Cambios en la intensidad de fluorescencia de R110 (520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Imagen 40 X.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (18 HR)
EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

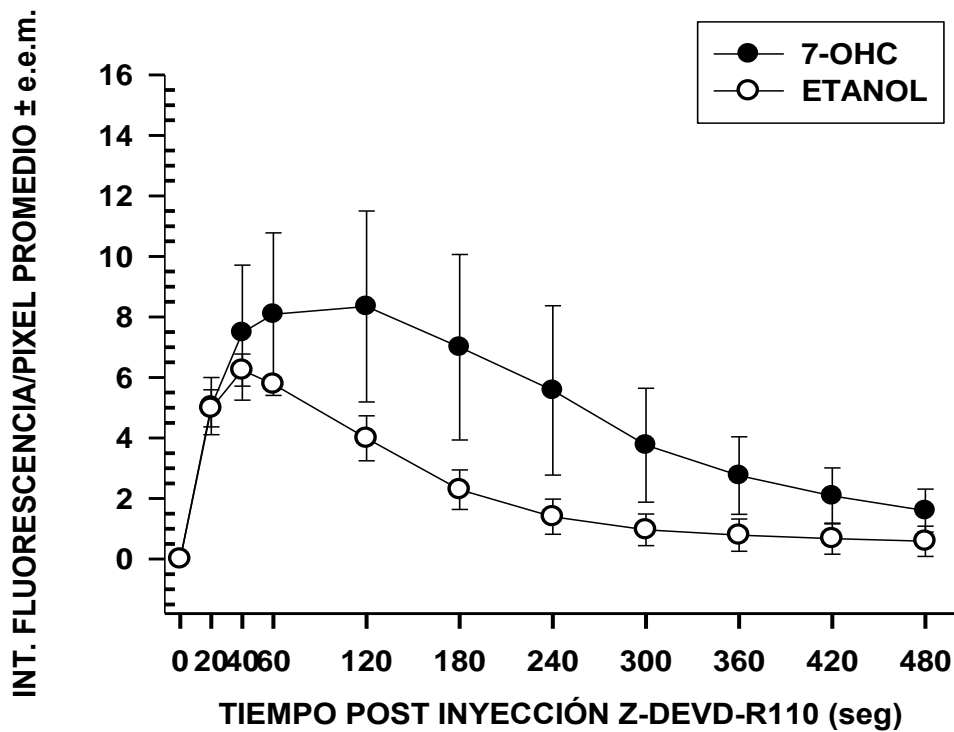


Figura15. Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis), prueba de Tukey y prueba de *T de Student*.

Para el curso temporal de la exposición a la 7-OHC se realizó análisis de varianza y se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (Kruskal-Wallis). Se procedió a realizar la prueba de Tukey para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los tiempos 40 s y 60 s. Cuando se realizó la comparación mediante prueba de T de Student entre el grupo tratado con el etanol y la 7-OHC, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a ninguno de los tiempos estudiados.

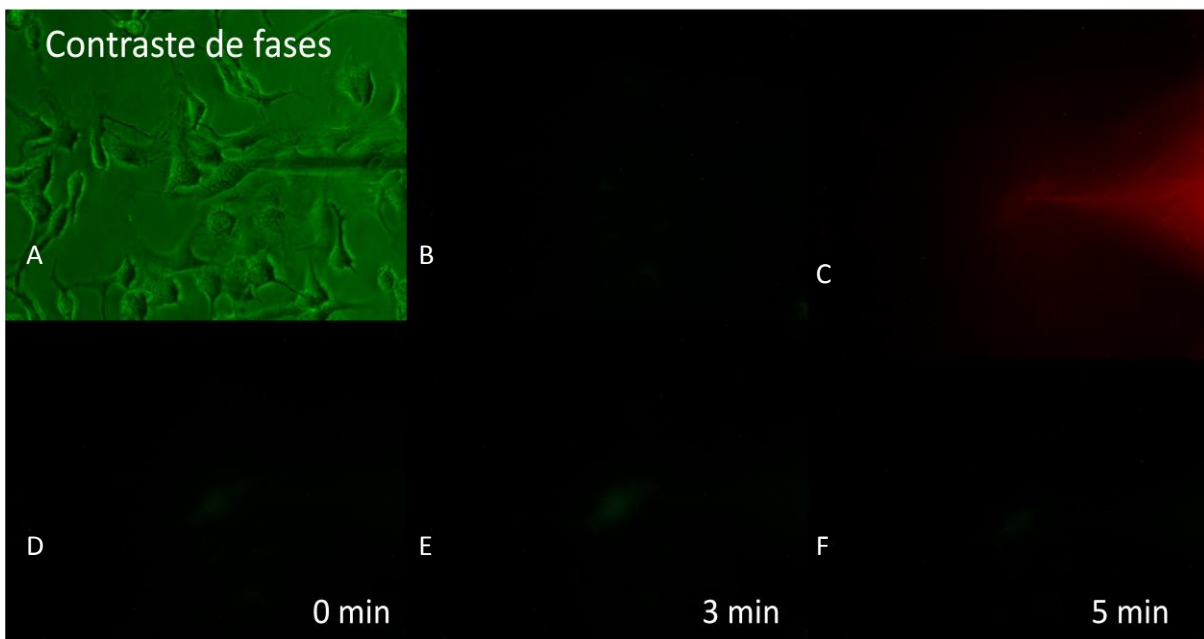


Figura 16. Fotografías obtenidas de la dinámica de activación de caspasa 3 en una célula A-549 tratada con 300 $\mu\text{g/ml}$ de 7-OHC durante 24 hrs. A) Contraste de Fase de la célula antes de la inyección. B) Célula sin fluorescencia antes de la inyección en microscopía de fluorescencia (520 nm) C) Célula positiva a la Tinción con Rojo de Texas (615 nm) lo que indica que la célula fue microinyectada D-F) Cambios en la intensidad de fluorescencia de R110 (520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Imagen 40 X.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (24 HR)
EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

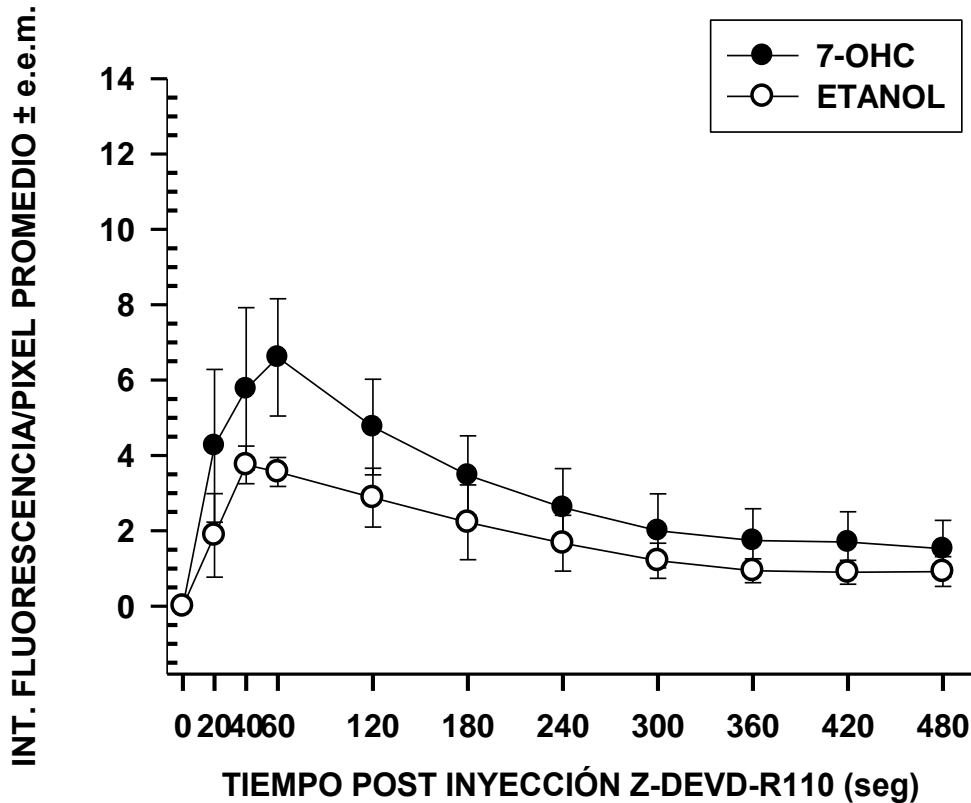


Figura17. Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis), prueba de Dunn's y prueba de *T de Student*.

En el caso del curso temporal de la exposición a la 7-OHC se realizó análisis de varianza y se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (Kruskal-Wallis). Se procedió a realizar la prueba de Dunn's para identificar a los grupos diferentes con respecto al tiempo cero, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a los tiempos 40 s; 60 s; 120 s y 180 s. Cuando se realizó la comparación mediante prueba de *T de Student* entre el grupo tratado con el etanol y la 7-OHC no se observaron diferencias estadísticamente significativas a ninguno de los tiempos estudiados.

Tabla II. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 RESPECTO A SU CONTROL (ETANOL).

Tiempo de exposición a 7-OHC (hrs)	Porcentaje de incremento de actividad de caspasa 3	Tiempo de mayor actividad de caspasa 3 (seg)
3	512 %	120
6	355 %	180
12	378 %	40
18	209%	120
24	132%	60

4. Análisis de la velocidad inicial de la cinética de caspasa 3

Con la finalidad de analizar las velocidades iniciales de los cursos temporales obtenidos correspondientes a la actividad de caspasa 3 inducida por 7-OHC, se estudió la existencia de procesos lineales para ambos tratamientos con sus respectivos intervalos de confianza.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (3 hr)
A LA 7-HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

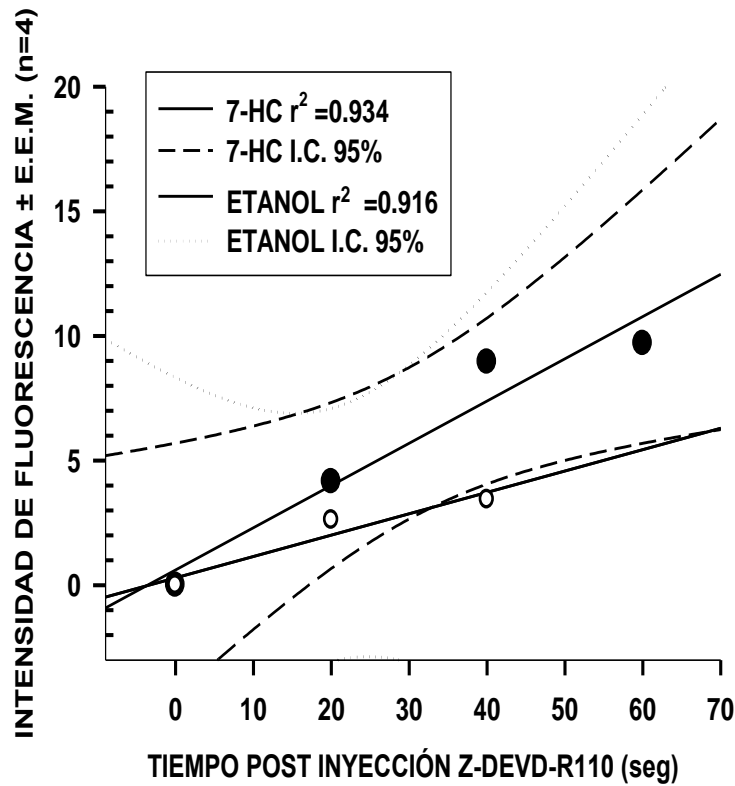


Figura 18. Se observa una regresión lineal de la activación de la caspasa 3 con pendiente distinta de cero $p=0.033$ y el intervalo de confianza para la 7-hidroxicumarina es poco abierto. Aunque el valor de la regresión lineal del disolvente de la 7-hidroxicumarina es muy aceptable, la prueba estadística revela que la pendiente no es distinta de cero $p=0.186$, se observa un intervalo de confianza muy abierto, reflejando mucha dispersión de los datos.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (6 hr)
A LA 7-HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

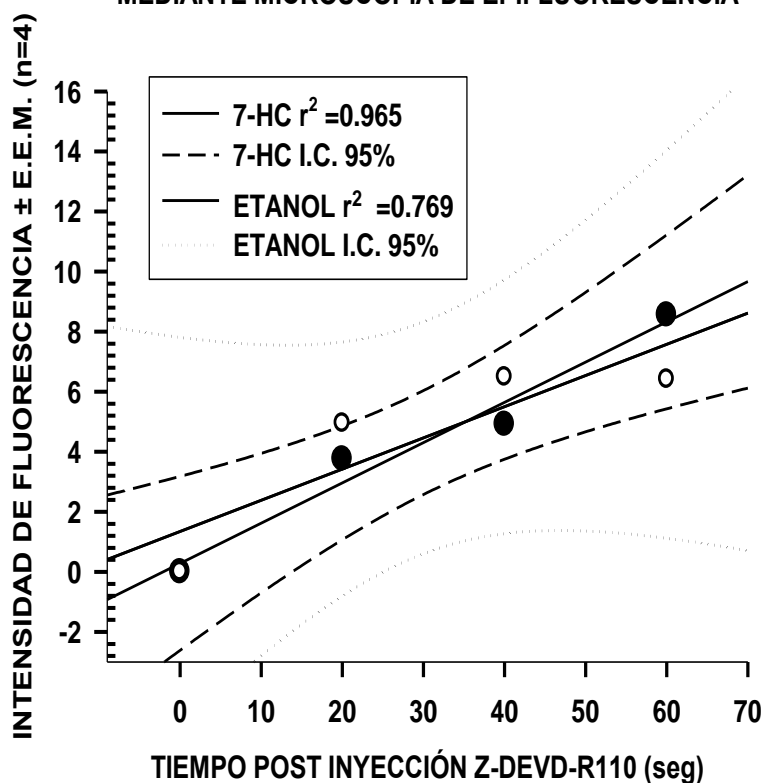


Figura 19. Se observa una regresión lineal de la activación de la caspasa 3 con pendiente distinta de cero $p=0.018$ y el intervalo de confianza para la 7-OHC. El valor de la regresión lineal del disolvente de la 7-OHC es poco aceptable, la prueba estadística revela que la pendiente no es distinta de cero $p=0.123$, se observa un intervalo de confianza muy abierto, reflejando una gran dispersión de los datos.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (12 hr)
A LA 7-HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

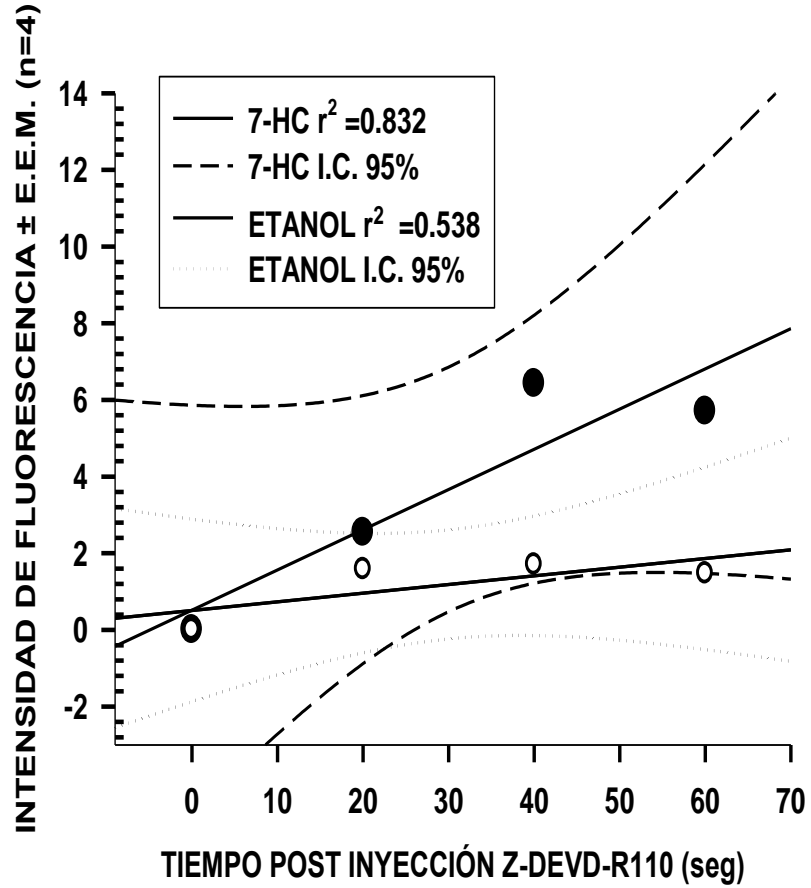


Figura 20. Se observa una regresión lineal de la activación de la caspasa 3 con pendiente que no es distinta de cero $p=0.087$ y el intervalo de confianza para la 7-OHC es muy abierto indicando una gran dispersión de los datos. El valor de la regresión lineal del disolvente de la 7-OHC es poco aceptable, la prueba estadística revela que la pendiente no es distinta de cero $p=0.266$, aunque se observa un intervalo de confianza poco abierto, reflejando poca dispersión de los datos.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (18 hr)
A LA 7-HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

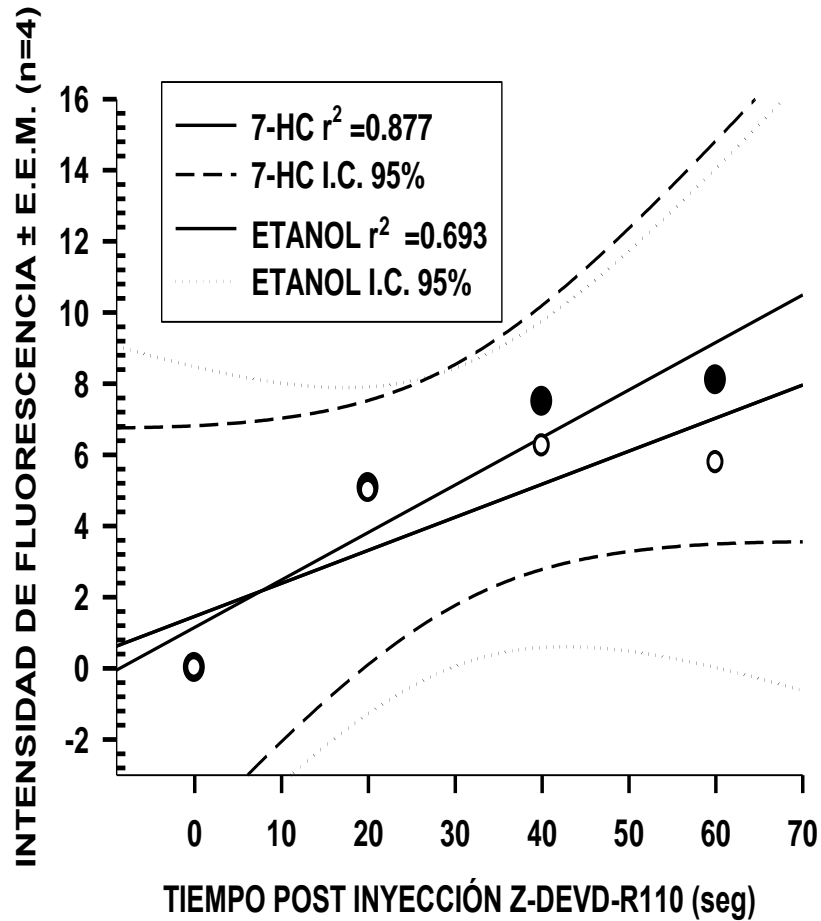


Figura 21. Se observa una regresión lineal de la activación de la caspasa 3 con pendiente que no es distinta de cero $p=0.063$ y el intervalo de confianza para la 7-hidroxycumarina muy abierto indicando una gran dispersión de los datos. El valor de la regresión lineal del disolvente de la 7-hidroxycumarina es poco aceptable, la prueba estadística revela que la pendiente no es distinta de cero $p=0.167$, se observa un intervalo de confianza muy abierto, reflejando gran dispersión de los datos.

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPOSICIÓN (24 hr)
A LA 7-HIDROXICUMARINA EN CÉLULAS A-549
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3
MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA**

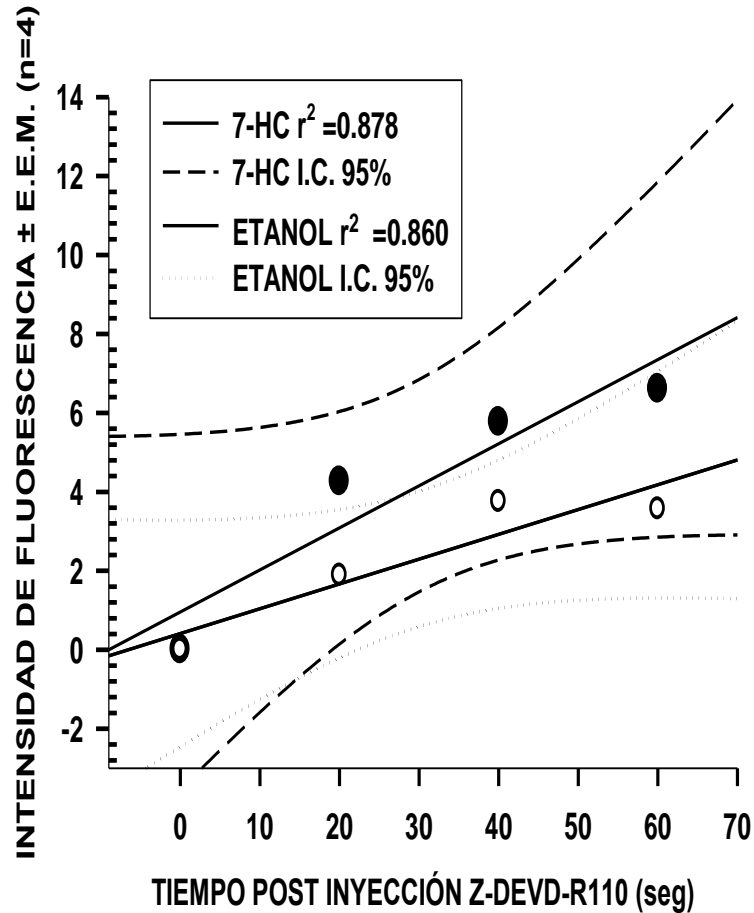


Figura 22. Se observa una regresión lineal de la activación de la caspasa 3 con pendiente que no es distinta de cero $p=0.063$ y el intervalo de confianza para la 7-hidroxicumarina muy abierto indicando una gran dispersión de los datos. El valor de la regresión lineal del disolvente de la 7-hidroxicumarina es aceptable, la prueba estadística revela que la pendiente no es distinta de cero $p=0.072$, se observa un intervalo de confianza poco abierto, reflejando escasa dispersión de los datos.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En cuanto a la elaboración de las micropuntas, observar la forma y medir el diámetro de las micropuntas elaboradas antes de cada experimento fue importante, ya que estas características varían si hay fluctuaciones en la temperatura del ambiente y la humedad (Zhang Y, 2007). Además que se comprobó de esta manera que no hubieran artefactos que obstruyeran la punta de los capilares.

En relación a los parámetros de tiempo y presión de microinyección obtenidos para este tipo de células y con el equipo de microinyección Narishige IM300, se encuentran dentro de los intervalos sugeridos en la literatura (Alcaraz-Pérez,2009) (Zhang Y, 2008).

De acuerdo a la Figura 9, a las 3 horas de exposición a la 7-hidroxycumarina, se observó una cinética enzimática característica desde el tiempo cero y hasta los 180 s, con incrementos estadísticamente significativos respecto del tiempo cero y hasta los 180 s en donde llega a su velocidad máxima la actividad de la caspasa 3. Cuando se compara con la cinética de las células expuestas al disolvente hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cinética del etanol de los 40 y hasta los 120 s ($p < 0.05$ t de Student). La regresión lineal de la cinética para la 7-hidroxycumarina tiene pendiente diferente de cero entre 0 y 60 s ($r^2 = 0.934$ y $p = 0.033$), a diferencia de la regresión lineal del etanol que no tiene pendiente diferente de cero ($p = 0.186$). Se procedió a realizar el análisis Post-hoc de estos datos y no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa.

La cinética enzimática de la exposición a la 7-hidroxycumarina, a las 6 horas, igualmente muestra incrementos estadísticamente significativos respecto del tiempo cero hasta los 180 s. Sin embargo, en este caso no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa al comparar cada uno de los tiempos con las células tratadas con etanol. Solamente la regresión de la 7-hidroxycumarina ($r^2=0.965$) mostró pendiente diferente de cero ($p=0.018$), aunque el valor de la regresión del disolvente es aceptable, no mostró pendiente diferente de cero ($p=0.123$).

A los demás tiempos estudiados de exposición a la 7-hidroxycumarina, 12, 18 y 24 horas, también se observaron incrementos estadísticamente significativos con respecto de sus tiempos cero, lo que mostró que la actividad enzimática de la caspasa 3 tenía un comportamiento característico. Sin embargo, al hacer la comparación estadística para cada tiempo con respecto a la actividad de las caspasa 3 en las células tratadas con el disolvente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso. En todos los casos las regresiones lineales no mostraron pendientes distintas de cero.

Por lo tanto, con base a nuestros resultados, el efecto más importante y claramente observado fue a las 3 horas de exposición a la 7-hidroxycumarina. Aunque también a las 6 horas de exposición se observó una regresión lineal con pendiente distinta de cero, no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células tratadas con el disolvente.

Estos resultados concuerdan con los que reportó previamente López-González en 2004 (Lung cancer 2004:43;275-283) ya que observó un incremento en las células apoptóticas (línea celular A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano), expuestas a la 7-hidroxicumarina durante 4 horas a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, del 12.5 al 21%, estimadas mediante el indicador anexina V, por citometría de flujo, aunque nosotros empleamos una línea celular diferente (A-549) y prácticamente el doble de la concentración de la 7-hidroxicumarina.

Hasta donde sabemos, el estudio de la cinética *ex vivo* que nosotros empleamos en este estudio, no se ha reportado a la fecha, la complejidad de la técnica de microinyección lo limita. Sin embargo, como puede observarse de nuestros resultados, la obtención de cinéticas enzimáticas altamente confiables, específicas y reproducibles, las que además pueden documentarse digitalmente para su análisis objetivo y cuantificable a través de microfotografía digital y análisis de imágenes pixel por pixel, permite obtener información que por otros métodos sería muy difícil de obtener (Bioquímica de proteínas), además sería imposible hacerlo *ex vivo*.

Es verdad que la "N" de células microinyectadas en este estudio es pequeña, sin embargo la consideramos válida ya que permitió el análisis estadístico completo, permitió elaborar los cursos temporales, hacer la comparación para cada intervalo de tiempo intragrupo (cero a 480 s) y comparar los intervalos entre fármaco y su disolvente (t de Student), así como elaborar las regresiones lineales y aplicar las pruebas estadísticas para las pendientes (análisis de varianza) y conocer si son verdaderas regresiones lineales.

Otro de los objetivos de esta investigación fue localizar la dinámica de la caspasa 3 dentro de la célula, y se pudo observar, como se muestra en todas las microfotografías que la fluorescencia debida a la actividad de esta proteasa no está localizada en algún organelo de la célula sino que es ubicua en el citoplasma.

Sin embargo, queda abierta la posibilidad de aplicar esta técnica que hemos podido implementar en el laboratorio de Inmunofarmacología al estudio de otros problemas que lo requieran y continuar con el estudio de la dinámica *ex vivo* de la apoptosis inducida por cumarinas simples.

VII. CONCLUSIONES

1. Con base en nuestros resultados podemos concluir que se determinó la dinámica *ex vivo* de la actividad específica de la caspasa 3, inducida por el tratamiento con 7-hidroxicumarina en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549, mediante la técnica de microinyección en célula única, por microscopía de epifluorescencia, la cual fue estadísticamente significativa después de la exposición durante 3 horas al compuesto cumarínico.
2. Se obtuvieron los cursos temporales de activación de la caspasa 3 en células tratadas con 7-hidroxicumarina o 7-hidroxicumarina disuelta en etanol.
3. Obtuvimos un registro mediante microfotografía digital y el análisis de imágenes de la dinámica *ex vivo* de este proceso.

4. Se rechaza la hipótesis nula del trabajo y se acepta la Hipótesis alterna:

H1: En las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas con 7-hidroxicumarina o 7-hidroxicumarina disuelta en etanol, sí hay diferencia estadísticamente significativa en la inducción de la actividad de la caspasa 3 cuantificada mediante la técnica de microinyección en célula única por microscopía de epifluorescencia.

5. Implementamos en nuestro laboratorio la técnica de la microinyección en célula única, el registro digital de imágenes mediante microfotografía digital y el análisis de imágenes para realizar estudios de Farmacología celular.

VIII. REFERENCIAS

1. Alcaraz-Pérez F, Mulero V, Cayuela ML. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos. *BMC Biotechnology* 2009. 8:81(1-8).
2. Asiri A.M. Synthesis and characterization of new coumarin derivatives as ultraviolet absorbers. *Pigment & Resin Technology* 2003. 32:5,326-330.
3. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The New World Health Organization Classification of lung tumors. *Eur Respir J.* 2001; 18: 1059-1068.
4. Bröker L, Kruyt F, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A review. *Clin Cancer Res* 2005, 11;9:3155-3162.
5. Coleman M, Sahai E, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson M. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of Rock-1. *Nature cell biology* 2001, 3; 339-345.
6. Contassot E, Galde O, French LE. Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin.* 2007; 25: 487-501.
7. Cotter T. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature* 2008; 9; 501-507.
8. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 502-511
9. Elinos-Báez CM, León F, Santos E. Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and bax expression in two human lung cancer cell lines in vitro. *Cell Biol Int.* 2005;29:703-706.
10. Evan G, Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001, 411, 342-348.
11. Federal Institute for Risk Assessment. 2006. Revisado en marzo 2014. http://www.bfr.bund.de/en/frequently_asked_questions_about_coumarin_in_cinnamon_and_other_foods-8487.html
12. Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. A study of the role of cell cycle events mediating the action of coumarin derivatives in human malignant melanoma cells. *Cancer Lett.* 2004;214:43-54.
13. Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* 2009;281:128-133.
14. Ghobrial I, Witzig T, Adjei A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer Journal for Clinicians* 2005; 55;3:178-194.
15. Goel A, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B, Saini N. Apoptogenic effect of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin and 7,8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in human lung adenocarcinoma cell line: role of NF-kappaB, AKT, ROS and Map kinase pathway. *Chem Biol Interact.* 2009; 179:363-374.
16. Herbst RS, Heymach JV, Smith L, Lippman SM. Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1367-1380.
17. Hunter A, LaCasse E, Korneluk R. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12: 1543-1568.

18. INEGI 2011. Revisado en marzo 2014. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../cancer0.doc
19. Jiménez-Orozco FA, López-González JS, Nieto-Rodríguez A, Velasco-Velázquez MA. Decrease of cyclin D in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung cancer*. 2001;34:184-194.
20. Kawai S, Tomomo Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res* 2001;21;917-924.
21. Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 423-453
22. Lavrik I, Golks A, Krammer P. Caspases: pharmacological manipulation of cell death 2005, 115; 2665-2672.
23. López-González JS, Prado-García H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 2004; 43c 275-283.
24. López-González JS, Prado-García H, Molina-Guarneros J et al. Mechanisms of Antitumor Effects of Simple Coumarins in Murine Melanoma and Human Non-small Cell Lung Carcinoma Cell Lines. *Nova* 2008. 99-112.
25. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, Weiss L, Urban D, Bueschen A, Markiewicz M. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J. Cancer Res. Clin Oncol* 1994; 120:S39-S42.
26. Musa M., Badisa V, Latinwo L, Patterson T, Owens M. Coumarin-based Benzopyranone Derivatives Induced Apoptosis in Human Lung (A-549) Cancer Cells. *Anticancer Research* 2012; 32:4271-4276.
27. Nasr, T. Bondock, S. Youns, M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 76, 539-548
28. National Cancer Institute. Lung Cancer. Revisado en enero 2012. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/lung>.
29. Occupational Safety and Health Organization 1998. NIOSH Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Revisado en marzo 2014. https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_229620.html
30. Ouyang, L. Shi, Z. Zhao, S. Wang, T. Zhou, T-T. Liu, B. and Bao, K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2012, 45, 487-498.
31. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 238-259.
32. Rehm E.J, Hannibal R.L., Chaw R.C., Vargas-Villa M.A., Patel N.H. Injection of *Parhyale hawaiiensis* Blatomeses with Fluorescently Labeled Tracers. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2009. 4;1 (1-5).
33. Schulze-Bergkamen H, Krammer P.H. Apoptosis in Cancer-Implications for Therapy. *Semin Oncol* 2004; 31(1): 90-119.
34. Soto Núñez, Maribel. 2008. Estudio in vitro del mecanismo de acción inductor de la apoptosis de la 7-hidroxycumarina en líneas de

- adenocarcinoma pulmonar humano. Tesis de maestría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
35. Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY, Corrigan T, Daly P, Edwards G, Gaffney E. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: S32-S34.
 36. World Health Organization (Disponible en http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/)
 37. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Jackson R, Edwards R, Hendley E, Sang-Hee K, O'Donnell JR, O'Dell R, Tornyos K, Kwan HC. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* 1981;245(8):831-835.
 38. Zhang, Y. Single-Cell Microinjection Technologies, *Methods in Molecular Biology* 2012, vol. 853, 169-174.
 39. Zhang, Y., and Yu, L.C. Microinjection as a tool of mechanical delivery, *Current Opinion in Biotechnology* 2008. 19, 506-510.
 40. Zhang, Y. Microinjection technique and protocol to single cells, *Neurobiology* 2007. 10.1038.
 41. Zhang, Y., and Yu, L.C. Single-cell microinjection technology in cell biology, *Bioessays* . 2008 30.6, 606-609.

IX. GLOSARIO

Ácido aspártico: aminoácido no esencial

Actina: proteína globular que conforman los microfilamentos del citoesqueleto celular.

Adenocarcinoma: cáncer que empieza en las células glandulares

Aflatoxina: toxina producida por hongos del género *Aspergillus*.

Antibiótico: sustancia química que actúa sobre bacterias dejándolas no viables.

Antifúngico: sustancia capaz de inhibir el crecimiento de hongos.

Antineoplásico: sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas.

Antioxidante: sustancia de fácil oxidación que protege a otras biomoléculas de ser oxidadas.

Apoptosis: Muerte celular programada.

Apoptosoma: Complejo formado por la proteína Apaf-1, citocromo C y procaspasa 9 en etapa tardía de la apoptosis.

Arsénico: Elemento químico ampliamente distribuido en la naturaleza.

Benceno: hidrocarburo aromático de fórmula molecular C_6H_6 .

Blebs: evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana en el proceso apoptótico.

Biolística: Técnica de transfección celular que consiste en el recubrimiento de una nanopartícula compuesta de algún sólido inerte, (generalmente oro) con el material que se desea introducir a la célula, que es "disparada" directamente en el núcleo de la célula diana.

Ciclina: proteínas cuya función es regular el ciclo celular.

Cimógeno: precursor enzimático sin actividad catalítica que necesita un cambio en su estructura para su activación.

Cinasa: enzima que modifica sus sustratos por medio de fosforilación.

Cisteína: aminoácido no esencial.

Citocinas: proteínas secretadas por células del sistema inmunológico, endoteliales y epiteliales para su comunicación en respuesta a un antígeno.

Citocromo C: proteína que funciona como transportadora de electrones ubicada en la membrana mitocondrial.

Citoesqueleto: red intracelular de filamentos de origen proteico que dan sustento y estructura a las células.

Electroporación: Técnica de transfección que consiste en la aplicación de un impulso eléctrico de alto voltaje que provocan la formación de poros en la membrana celular.

Endonucleasa: enzima que hidroliza los ácidos nucleicos, también llamada enzima de restricción.

Epigenética: Estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia.

Fagocitosis: mecanismo celular de introducción de partículas sólidas a la célula rodeándolas con su membrana citoplasmática.

Fluorocromo: componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente.

Gelsolina: proteína que tiene función en ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina.

Genes supresores: genes cuya expresión inhiben el crecimiento celular en condiciones normales.

Homeostasis: propiedad de los organismos vivos de permanecer en un estado estable.

Ligasa: enzima que cataliza la unión de fragmentos de DNA.

Metástasis: diseminación de células neoplásicas desde el tejido neoplásico original a otros tejidos.

Microinyección: técnica de introducción de sustancias exógenas en el núcleo o en el citoplasma de las células penetrando la membrana celular y/o nuclear con microagujas.

Mutación: cambio o alteración en la secuencia de ADN de un ser vivo.

Paraptosis: Tipo de muerte celular asociado a la activación masiva de células sintetizadoras de citocinas inflamatorias.

Péptido: molécula constituida por una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Plectina: proteína que une los filamentos de actina y microtúbulos para conformar el citoesqueleto.

Procaspasa: proteína precursora de una caspasa.

Proliferación: crecimiento o multiplicación de células.

Proteasa: enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.

Proteólisis: degradación o ruptura de proteínas.

Proto-oncogenes: genes cuya expresión promueve el crecimiento y la división de la célula.

Sustrato: molécula que se une de manera específica a una enzima y sobre la cual ésta actúa.

Transfección: introducción de biomoléculas externas a células eucariotas.

Ubiquitina: proteína que se acopla a otras proteínas con el objetivo de marcarlas para su degradación.

Vías de señalización: grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior.

Vibraciones ultrasónicas: Técnica de transfección que consiste en la apertura de poros en la membrana de las células a través de una fuente de vibraciones ultrasónicas.