



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO PROTECTOR DE LA DEXAMETASONA
EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL
CISPLATINO.

EL PAPEL DE NOXA, PUMA Y SNAIL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDGAR ORTIZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Rodríguez Penagos Mireya

VOCAL: Profesor: Plasencia de la Parra Francisco Javier

SECRETARIO: Profesora: Espinosa Castilla Magali

1er. SUPLENTE: Profesora: Ibarra Rubio María Elena

2° SUPLENTE: Profesora: Carmona Salazar Laura

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del
Instituto Nacional de Medicina Genómica

ASESOR DEL TEMA: Dra. Magali Espinosa Castilla _____

SUSTENTANTE: Edgar Ortiz Hernández _____

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

aa – Aminoácidos	μM – Micromolar
ADN – Ácido desoxirribonucleico	M – Molar
ADNc – Ácido desoxirribonucleico complementario	min – Minutos
ARN – Ácido ribonucleico	MgCl₂ – Cloruro de magnesio
ARNm – Ácido ribonucleico mensajero	mm – Milímetros
Bcl-2 – Gen de células B2 de linfoma	N – Átomo de nitrógeno
BH – Dominio de homología a Bcl-2	nm – Nanómetros
°C – Grados Celsius	pb – Pares de bases
C – Átomo de carbono	ρM – Picomolar
Ca²⁺ – Iones de calcio II	PBS – Solución buffer fosfato salino
CO₂ – Dióxido de carbono	PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
CP – Cisplatino	PVDF – Polifluoruro de vinilideno
DAB – 3,3'-diaminobezidina tetrahidrocloruro	RNAse – Ribonucleasa
DEX – Dexametasona	SFB – Suero fetal bovino
dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfato	TBS – Solución buffer tris salino
GAPDH – Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa	TEM – Transición epitelio-mesénquima
GR – Receptor de glucocorticoides	Tm – Temperatura de alineación
h – Horas	v/v – Proporción volumen-volumen
kDa – kiloDalton	WB – Western blot
μL – Microlitros	% – Porcentaje

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Características de las células cancerosas.
- Figura 2.** Incidencia y mortalidad del cáncer en México.
- Figura 3.** Etapas del desarrollo tumoral.
- Figura 4.** Estructura molecular del cisplatino.
- Figura 5.** Mecanismo de acción del cisplatino.
- Figura 6.** Efectos citotóxicos del cisplatino.
- Figura 7.** Vías de la apoptosis.
- Figura 8.** Miembros de la familia Bcl-2.
- Figura 9.** Biosíntesis de los glucocorticoides.
- Figura 10.** Estructura molecular de la dexametasona.
- Figura 11.** Señalización del receptor de glucocorticoides.
- Figura 12.** Efecto de la DEX en la apoptosis de las células HeLa.
- Figura 13.** Viabilidad de las células HeLa expuestas al tratamiento con DEX/CP.
- Figura 14.** Integridad del ADN de las células HeLa durante los tratamientos con DEX y/o CP.
- Figura 15.** Esquema de tratamiento para la evaluación del efecto de la DEX en la apoptosis inducida por CP.
- Figura 16.** Esquema de tratamiento para el análisis de la expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail.
- Figura 17.** Esquema de tratamiento para el análisis de los niveles de expresión de Noxa, PUMA y Snail.
- Figura 18.** Viabilidad de las células HeLa expuestas al CP.
- Figura 19.** Viabilidad de las células HeLa en los tratamientos con DEX y/o CP.
- Figura 20.** Morfología de las células HeLa ante los diferentes estímulos.
- Figura 21.** Estandarización de los oligos de amplificación.
- Figura 22.** Expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail durante los tratamientos con DEX y/o CP.
- Figura 23.** Niveles de expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail a las 12 h de tratamiento.
- Figura 24.** Niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail a las 12 h de tratamiento.
- Figura 25.** Expresión y localización celular del receptor de glucocorticoides a las 12 h de tratamiento.

ÍNDICE DE TABLAS

-

Tabla 1. Agentes quimioterapéuticos.

Tabla 2. Especificaciones de los oligos empleados.

Tabla 3. Condiciones de los anticuerpos empleados en WB.

Tabla 4. Condiciones del anticuerpo empleado en Inmunocitoquímica.

Tabla 5. Condiciones de la estandarización de amplificación de los oligos.

CONTENIDO

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
1. Cáncer.....	2
1.1 Epidemiología del cáncer.....	3
2. Desarrollo tumoral.....	4
3. Quimioterapia.....	5
4. Cisplatino.....	6
4.1 Mecanismo de acción.....	6
5. Apoptosis.....	8
5.1 Etapas y morfología de la apoptosis.....	8
5.2 Vías de la apoptosis.....	8
5.3 Apoptosis y cáncer.....	11
6. Familia de proteínas Bcl-2.....	12
6.1 Noxa.....	13
6.2 PUMA.....	14
7. Snail.....	15
8. Glucocorticoides.....	17
8.1 Biosíntesis de los glucocorticoides.....	17
8.2 Glucocorticoides y cáncer.....	18
8.3 Dexametasona.....	19
8.4 Receptor de glucocorticoides.....	19
III. Antecedentes	21
IV. Justificación	24
V. Objetivos	25
1. Objetivo general.....	25
2. Objetivos particulares.....	25
VI. Material y método	26
1. Línea celular.....	26
2. Cultivo celular.....	26
3. Dosis letal media del cisplatino	26
4. Viabilidad celular (técnica del Cristal Violeta)	26

5.	Esquema de tratamiento con DEX y/o CP.....	27
5.1	Efecto de la DEX en la apoptosis inducida por el CP..	27
5.2	Análisis de los niveles de expresión del ARNm.....	28
6.	Extracción de ARN total.....	29
7.	Síntesis de ADN complementario.....	29
8.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	29
8.1	Análisis de los niveles de expresión de Noxa, PUMA y Snail.....	30
9.	Extracción de proteínas totales.....	31
10.	Western blot.....	31
11.	Inmunocitoquímica.....	32
VII.	Resultados.....	34
1.	Dosis letal media (DL ₅₀) del cisplatino.....	34
2.	Efecto protector de la DEX en la apoptosis inducida por el CP.....	35
3.	Análisis morfológico de la apoptosis.....	36
4.	Estandarización de los oligos de amplificación.....	38
5.	Niveles de expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail.....	39
6.	Niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail.....	42
7.	Localización celular del receptor de glucocorticoides.....	43
VIII.	Discusión de resultados.....	45
IX.	Conclusiones.....	47
X.	Perspectivas.....	48
XI.	Referencias bibliográficas.....	49

I. RESUMEN

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas ampliamente utilizadas en el tratamiento del cáncer por su eficacia en la reducción y prevención de diversos efectos adversos causados por los agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, se ha reportado que los glucocorticoides pueden inhibir la apoptosis de células de tumores sólidos inducida por una variedad de estímulos, dentro de ellos, el efecto de agentes quimioterapéuticos y el mecanismo molecular por el cual se produce esta protección no es aun del todo claro.

El objetivo de este trabajo fue conocer el papel de las proteínas reguladoras de la apoptosis Noxa, PUMA y Snail en el efecto protector de la dexametasona (DEX) ante la muerte celular por apoptosis. Para ello, se utilizó como modelo experimental la línea celular HeLa, derivada de adenocarcinoma de cérvix. Las células fueron tratadas en cuatro grupos distintos, un grupo con el glucocorticoide sintético DEX, un grupo con el agente antineoplásico cisplatino (CP), con el propósito de inducir la apoptosis celular, otro grupo con los estímulos combinados de DEX/CP, y un último grupo (control) de células sin tratamiento. Se evaluaron en curso temporal los cambios en la expresión de Noxa, PUMA y Snail a nivel de ARNm mediante PCR semicuantitativo y a nivel de proteínas mediante la técnica de WB. Por otro lado, se determinaron mediante inmunocitoquímica los niveles de expresión y la localización subcelular del receptor de glucocorticoides (GR) durante los tratamientos, esto para relacionar su activación por ligando con DEX y los cambios en la expresión de las proteínas reguladoras de la apoptosis.

Como resultado de este trabajo, se inhibió con DEX la apoptosis inducida por el CP en las células HeLa. Esta inhibición del proceso apoptótico no se correlacionó con los cambios observados en la expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail. Por otra parte, se observó una disminución en la expresión y translocación nuclear del GR en los estímulos con CP, lo cual pudiera estar relacionado con la regulación transcripcional del receptor y los cambios en la expresión de distintas proteínas reguladoras de la apoptosis.

II. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades originado por células con diversas modificaciones, las cuales, les confieren ventajas adaptativas como proliferación descontrolada, evasión de las señales de inhibición del crecimiento, replicación ilimitada, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, actividad invasiva y metastásica, entre otras (Figura 1) (Hanahan, 2011). Las células con las características antes mencionadas se denominan células cancerosas.

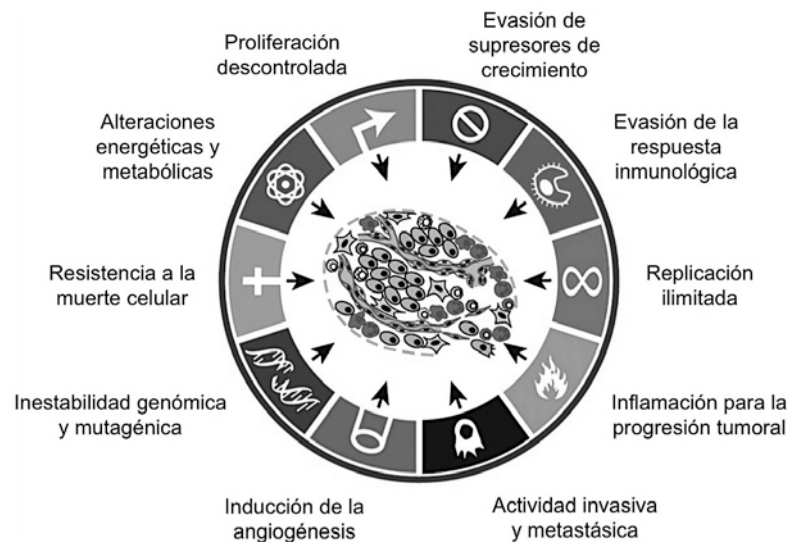


Figura 1. Características de las células cancerosas. Las características biológicas adquiridas por las células durante el desarrollo del cáncer constituyen un principio para comprender la complejidad del cáncer (Modificado de Hanahan, 2011).

Las células cancerosas se originan a partir de la acumulación de múltiples mutaciones en las células somáticas. Estas alteraciones se derivan de la continua interacción entre factores genéticos y ambientales (Stratton, 2009; Hanahan, 2011). Las células cancerosas presentan además cambios epigenéticos y profundas interacciones con su microambiente individual, lo que lleva a la heterogeneidad tumoral. Esta heterogeneidad es un factor decisivo para el avance de la enfermedad, dado que prevé la posibilidad de adaptación a diversos microambientes tisulares, clave para la progresión tumoral, la invasión y la metástasis (Fidler, 2002; Lauren, 2009; Quail, 2013).

1.1 Epidemiología del cáncer

A nivel mundial, el cáncer representa un problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de muerte, y los niveles de mortalidad se incrementan cada año. En 2012, se estimaron en 14,1 millones los casos nuevos de cáncer, en 8,2 millones las muertes relacionadas con cáncer y, en 32,6 millones las personas que viven con cáncer (dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico) en todo el mundo (Globocan, 2012).

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (SSA, SPPS 2013). En la población femenina mexicana, el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino son los de mayor incidencia y mortalidad. En la población masculina mexicana el cáncer de próstata es el de mayor incidencia y mortalidad, seguido por el cáncer de pulmón. Sin embargo, el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y el cáncer de próstata el de mayor mortalidad, en la población mexicana en general (Figura 2) (Globocan, 2012).

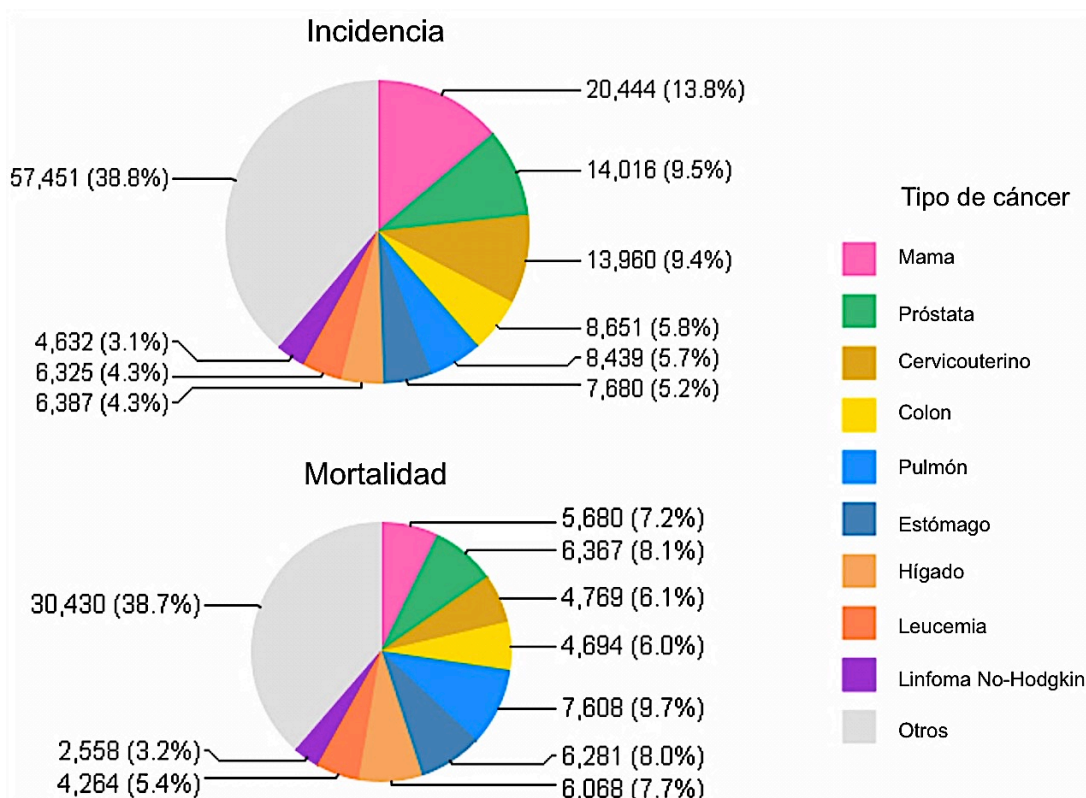


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en México. Porcentajes del número de casos y del número de muertes a causa de los principales tipos de cáncer en la población mexicana en el año 2012 (Modificado de GLOBOCAN, 2012).

2. Desarrollo tumoral

El origen de una célula cancerosa da lugar al desarrollo de un tumor. El desarrollo de un tumor comienza cuando en una célula de una población normal ocurren cambios genéticos y epigenéticos, los cuales aumentan su proliferación e inhiben su proceso de muerte (Weinberg, 1996; Yokota, 2000; Vincent, 2008). La célula con las alteraciones y su descendencia seguirán pareciendo normales morfológicamente aunque su condición proliferativa sea acelerada, a esta condición se le conoce con el término de hiperplasia. Sin embargo, la acumulación de alteraciones en esta célula puede generar la pérdida del control del crecimiento celular, dando origen a una descendencia morfológicamente distinta; condición que tiene por nombre displasia. Con el paso del tiempo, las células afectadas se vuelven aún más anormales en términos de su crecimiento y apariencia, cuando esta acumulación de células afectadas no excede los límites entre los tejidos, se genera una masa tumoral denominada tumor *in situ*. Eventualmente, las células dentro de este tumor, adquieren alteraciones adicionales que le permiten comenzar a invadir tejidos subyacentes a través de la entrada al torrente sanguíneo, estas células en circulación son propensas a establecer nuevos tumores en órganos distintos y llegar a ser letales mediante la interrupción del funcionamiento de un órgano vital; a esta última condición de invasión se le denomina metástasis (Figura 3) (Weinberg, 1996; Umar, 2012).

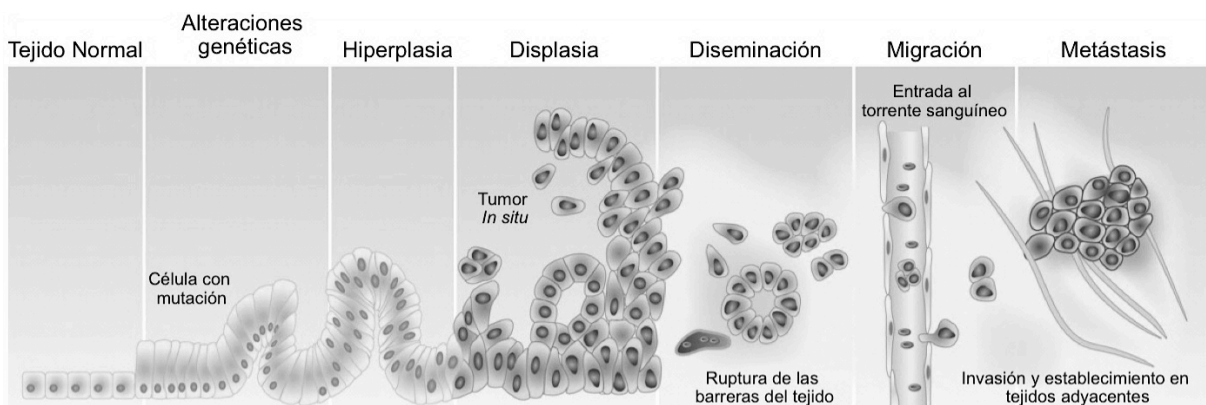


Figura 3. Etapas del desarrollo tumoral. La acumulación de cambios genéticos en una célula normal da origen a una célula cancerosa, la cual mediante su proliferación acelerada (hiperplasia) y su crecimiento descontrolado (displasia) da origen a un tumor *in situ*. La progresión tumor conlleva a la diseminación y entrada al torrente sanguíneo de algunas células cancerosas, las cuales migran hacia otros órganos donde se establecen para dar origen a un nuevo tumor (metástasis) (Modificado de Iacobuzio-Donahue, 2012).

3. Quimioterapia

Una de las estrategias para el tratamiento del cáncer es el uso de la quimioterapia, en la cual se utilizan diversos compuestos químicos con el objetivo de eliminar a las células cancerosas. Los fármacos empleados en la quimioterapia interfieren con la división celular, generan daño al ADN e inducen la muerte celular (Bruce, 2005; Masui, 2013). Los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes quimioterapéuticos			
Clasificación	Mecanismo de acción	Ejemplos	Principales tipos de cáncer tratados
Agentes alquilantes	Incorporación de grupos alquilo al ADN para evitar la replicación	Busulfán	Leucemia
		Clorambucil	Leucemia
		Carmustina	Linfoma, cerebro
Compuestos de platino	Daño al ADN mediante la formación de aductos e inducción de muerte celular	Cisplatino	Cervicouterino, vejiga, pulmón
		Carboplatino	Ovario, pulmón, cuello, cerebro
		Oxaliplatino	Colon
Inhibidores de la mitosis	Unión a proteínas tubulares e inhibición de la formación de microtúbulos del huso mitótico	Docetaxel	Pulmón, ovario, mama
		Paclitaxel	Pulmón, ovario, mama
		Vincristina	Leucemia
Antibióticos antitumorales	Intercalación en el ADN e inhibición del ciclo celular	Doxorrubicina	Leucemia, linfoma, vejiga
		Mitomicina	Esófago, riñón
Inhibidores de la topoisomerasa	Interfieren con la acción enzimática de la topoisomerasa	Topotecán	Pulmón, ovario, cervicouterino
		Irinotecán	Colon, pulmón, páncreas
		Etopósido	Pulmón, leucemia, linfoma
Antimetabolitos	Sustitución de componentes proteicos o de bases nitrogenadas	Metotrexato	Leucemia
		6-mercaptopurina	Leucemia
		5-fluorouracilo	Piel

(Adaptado de Masui, 2013; *The Merck Manual*, 2013).

La quimioterapia es considerada una herramienta esencial para detener la progresión tumoral y la diseminación del cáncer, con lo cual se puede mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, las principales limitantes de la quimioterapia son el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia de las células tumorales hacia los tratamientos, y la

producción de efectos adversos por el daño tóxico en las células normales a causa de los mecanismos de acción no selectivos de los fármacos quimioterapéuticos (Gottesman, 2002; Fodale, 2011).

4. Cisplatino

En el año de 1965, Rosenberg y cols. identificaron mediante la electrólisis de platino, una sal capaz de inhibir el crecimiento y la división celular de la bacteria *Escherichia coli* (Rosenberg; 1965, 1967). Esta sal fue denominada CP (Figura 4).

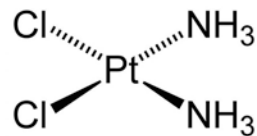


Figura 4. Estructura molecular del cisplatino. Representación estructural de la sal cis-diaminodicloroplatino II, [cis-PtCl₂(NH₃)₂, cDDP], encontrada por Rosenberg y cols.

El CP es un compuesto metálico inorgánico electrófilo que puede reaccionar con distintos sitios nucleófilos, tales como los grupos sulfhidrilo de las proteínas y los grupos amino de los ácidos nucleicos, aunque aproximadamente sólo el 1% del CP con localización intracelular reacciona con el ADN nuclear para producir daño (González, 2001).

4.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del CP, se basa en la interacción y consecuente producción de daño al ADN. El CP reacciona con las bases púricas, principalmente con el N₇ de la guanina, formando aductos intra e intercatenarios, aunque también puede existir la formación de aductos cruzados con el ADN y proteínas nucleares. El aducto más común es el que se forma entre guaninas adyacentes (Figura 5) (González, 2001; Wang, 2005; Roos, 2006).

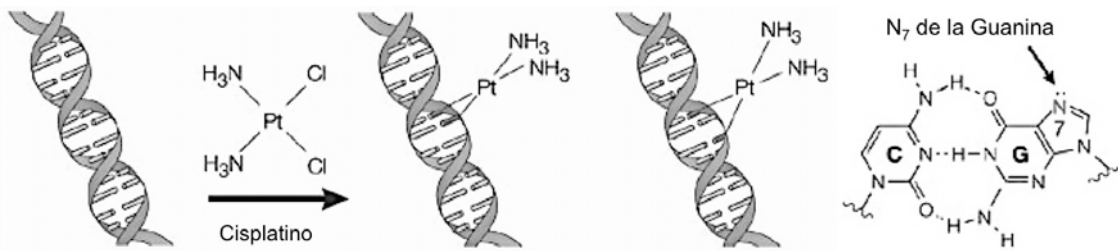


Figura 5. Mecanismo de acción del cisplatino. El CP daña al ADN formando aductos con las bases púricas, principalmente mediante la reacción con el N₇ de las guanina adyacentes de manera intra o intercatenaria (Modificado de Wang, 2005).

La acción citotóxica del CP inhibe la síntesis del ADN, y en menor medida, la síntesis de ARN y de las proteínas, lo cual se asocia con la inducción de la muerte celular y la inhibición de la proliferación celular. El daño al ADN puede inducir la muerte celular por la activación de la vía de señalización de p53 y la consecuente transcripción de genes inductores de la muerte celular, o bien, realizar la detección del ciclo celular en la fase G1 mediante la inhibición de las cinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, Cdk) en los complejos ciclina E/Cdk2 o ciclina D/Cdk4, o en la fase S por la inhibición del antígeno nuclear de las células en proliferación (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA). Ambas inhibiciones de las fases del ciclo celular son dependientes de la vía de p21 (Figura 6) (Rowland, 2006; Ge, 2012; Masui, 2013).

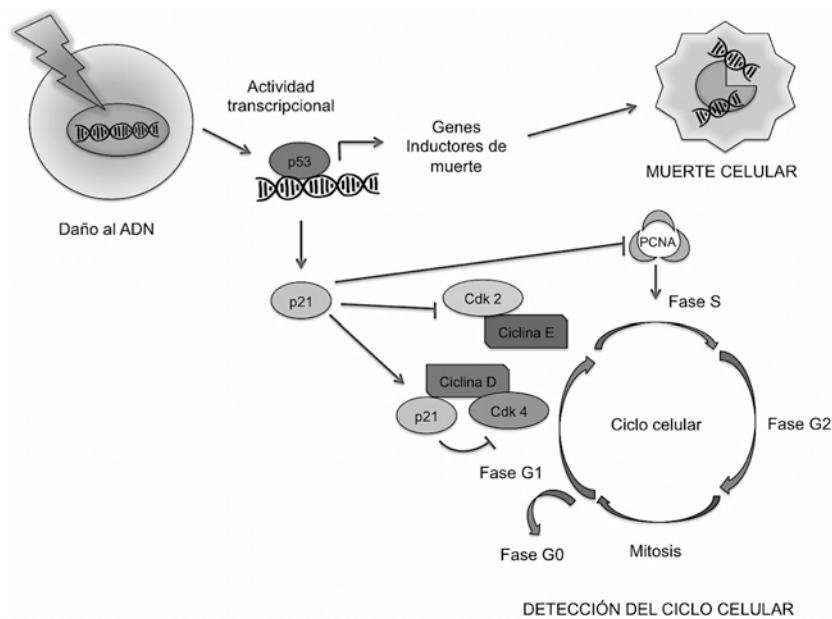


Figura 6. Efectos citotóxicos del cisplatino. El daño al ADN generado por el CP promueve la actividad transcripcional de p53 para inducir la expresión de genes que codifican proteínas reguladoras de la muerte celular y del gen p21 para implementar una respuesta de detección del ciclo celular (Adaptado de Rowland, 2006).

5. Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis ha sido reconocida como un mecanismo crítico que se conserva evolutivamente entre los eucariotas, el cual es indispensable en la embriogénesis, el desarrollo y la diferenciación tisular, y el mantenimiento de organismos multicelulares (Joza, 2001; Coates, 2010). En 1972 Kerr y cols. señalaron que las características morfológicas de la muerte celular ocurrida de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática y el balance homeostático entre la proliferación y la muerte en sistemas experimentales con roedores son diferentes a las que presenta la muerte que ocurre como resultado de patologías o intoxicación.

5.1 Etapas y morfología de la apoptosis

La apoptosis se puede dividir en dos etapas, la primera denominada etapa de latencia y la segunda denominada etapa de ejecución. La etapa de latencia inicia con la recepción de un estímulo de muerte y la acción de los mediadores de reparación de los daños celulares. Cuando los intentos de reparación fallan, las células se comprometen a la fase de ejecución, en la cual ocurren cambios que inducen a las células a morir (Ramírez, 1999). Dentro de los cambios morfológicos que sufren las células apoptóticas se encuentran; la reducción del tamaño celular, la condensación y fragmentación del material nuclear, la fragmentación de la membrana plasmática para la formación de vesículas denominadas cuerpos apoptóticos y la pérdida de la estructura del retículo endoplásmico. Los cambios bioquímicos incluyen la escisión del ADN cromosómico en fragmentos nucleosomales, la externalización de la fosfatidilserina de los lípidos de la membrana plasmática, la pérdida del potencial de la membrana en la mitocondria y el aumento en la actividad enzimática proteolítica (Kerr, 1972; Ameisen, 2002; Ouyang, 2012).

5.2 Vías de la apoptosis

En la actualidad se conocen tres vías de señalización molecular que conducen a la muerte celular por apoptosis. Una de las vías es la extrínseca, esta vía es dependiente de los receptores de muerte celular, las otras vías son

intrínsecas y están mediadas por la mitocondria y por el retículo endoplásmico. Estas vías de señalización convergen en la activación de los miembros de una familia de proteasas con residuos de cisteína denominadas caspasas, las cuales son los mediadores finales del proceso de apoptosis (Figura 7) (Sankari, 2012).

La vía extrínseca, se activa desde fuera de la célula por ligandos proapoptóticos que interactúan con receptores de muerte de la superficie celular. Los receptores de muerte celular pertenecen a una familia de proteínas con homología estructural al receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral (TNF- α), los cuales cuentan con un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos, denominado dominio de muerte. Este dominio transmite la señal de muerte de la superficie de la célula hacia el interior mediante vías de señalización intracelular (Ashkenazi, 2002; Fulda, 2006). La activación de los receptores de muerte celular resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras sobre el dominio citoplasmático del receptor para formar el complejo de señalización de la inducción de muerte (*death-inducing signalling complex*, DISC). La formación de este complejo da lugar al reclutamiento de la pro-caspasa 8, la cual por su activación proteolítica se activa (caspasa 8) y escinde a la pro-caspasa 3 para activarla y realizar la fase de ejecución de la apoptosis (Ashkenazi, 2008; Galluzzi, 2012).

La vía intrínseca que se activa desde el interior de la célula en la mitocondria, es iniciada por la recepción de distintas señales de muerte como la hipoxia, altas concentraciones citosólicas de iones Ca^{2+} , el daño al ADN, la radiación, la disminución de factores de crecimiento, el estrés oxidativo, entre otros. La percepción de estas señales provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de factores apoptóticos del espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol, tales como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (*apoptosis inducing factor*, AIF), el segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria (*second mitochondria-derived activator of caspasas*, Smac), y la proteína de unión directa a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (*inhibitors of apoptosis proteins*, IAPs) con bajo punto isoelectrónico (*direct IAP binding protein with low pI*, DIABLO)

(Galluzzi, 2012). El citocromo c presente en el citosol se asocia con la proteasa de apoptosis Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) para formar el complejo apoptosómico o apoptosoma y realizar la escisión de la pro-caspasa 9 e iniciar la activación proteolítica de pro-caspasas efectoras como la pro-caspasa 3, 6 y 7 (Kroemer, 2009; Sankari, 2012).

La vía intrínseca que se realiza desde el retículo endoplásmico es iniciada cuando el plegamiento de proteínas no es llevada a cabo con eficiencia. La acumulación de proteínas no plegadas constituye una forma de estrés para la célula y puede ser captado como un estímulo de muerte e inducir a la apoptosis (Rasheva, 2009). Para restablecer la homeostasis, se activan señales de respuesta a las proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR), las cuales son mediadas por tres sensores de estrés PERK (*pancreatic endoplasmic reticulum kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*), e IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*). Los sensores de estrés disminuyen la traducción de proteína para reducir y prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas, promueven la transcripción de enzimas plegadoras de proteínas y de componentes del retículo asociados a la degradación de proteínas mal plegadas (Tsai, 2002; Szegezdi, 2006). Cuando las señales UPR son insuficientes para reducir el estrés en el retículo endoplásmico se desencadenan los procesos inductores de muerte, como la activación de la pro-caspasa 12 que se escinde de manera independiente a la salida del citocromo c, la acumulación de iones Ca^{2+} en el citosol, y la activación de promotores de muerte como JNK (*c-jun N-terminal kinase*) y CHOP (*C/EBP homologous protein*), los cuales actúan sobre la modulación de la actividad de miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Szegezdi, 2006; Resheva, 2009; Tabas, 2011).

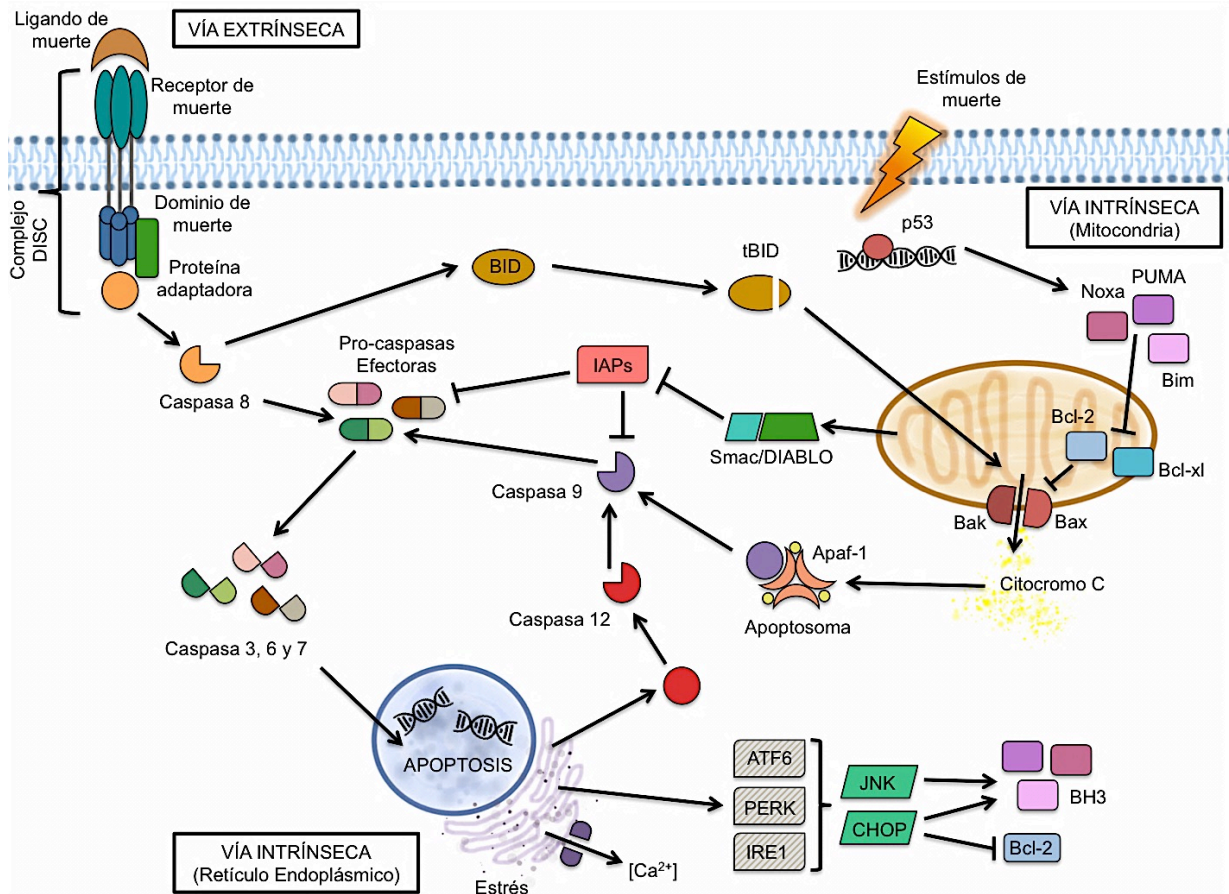


Figura 7. Vías de la apoptosis. Representación esquemática de la vía extrínseca (receptores de muerte) y de las vías intrínsecas (mitocondrial y del retículo endoplásmico) de la apoptosis. Las vías inducen la apoptosis mediante la cascada proteolítica de las caspasas iniciadoras 8, 9 y 12 que activan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, mediadores finales del proceso de apoptosis. La vía de los receptores de muerte puede conectarse con la vía mitocondrial mediante la activación de la proteína pro-apoptótica BID, la cual es truncada por la caspasa 8 e induce la salida del citocromo c de la mitocondria. Otros reguladores proteicos del proceso de apoptosis son los miembros de la familia de proteínas Bcl-2, los cuales pueden regular de manera positiva o negativa la vía mitocondrial de la apoptosis (Adaptado de Bai, 2014).

5.3 Apoptosis y cáncer

La apoptosis es un proceso regulado por una gran variedad de proteínas. Por tal motivo, el desequilibrio entre los niveles de expresión de las proteínas inductoras y las proteínas inhibidoras de la apoptosis puede alterar el balance entre la proliferación y la muerte celular (Fesik, 2005).

La supresión de la apoptosis ha sido ampliamente reconocido como un sello distintivo de la mayoría de las células cancerosas en los distintos tipos de cáncer (Hunter, 2007; Hanahan, 2011). Las células cancerosas son capaces de evadir la apoptosis mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales se

encuentra la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas o la inhibición de proteínas pro-apoptóticas (Pflaum, 2014).

En la actualidad, gran parte de los fármacos empleados en la quimioterapia inducen apoptosis, por lo tanto, el estudio de los mecanismos de resistencia y el análisis de las alteraciones de las proteínas reguladoras de la apoptosis pueden contribuir a la mejora en los tratamientos contra el cáncer (Lowe, 2000; Fulda, 2006). Dentro de este contexto, una de las familias de proteínas reguladoras de la apoptosis ampliamente estudiada, es la familia de proteínas Bcl-2, ya que los miembros de esta familia determinan el compromiso de las células a la apoptosis mediante su interacción en la mitocondria. El conocimiento de los mecanismos en las funciones de los miembros de la familia Bcl-2, las consecuencias fisiopatológicas de su desregulación y la búsqueda de blancos terapéuticos para terapias contra el cáncer, son algunas de las premisas en las cuales se han enfocado los estudios de la familia Bcl-2 en los últimos años (Czabotar, 2014).

6. Familia de proteínas Bcl-2

El gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma gene 2*), del cual deriva la familia de proteínas del mismo nombre, fue descubierto en la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 t(14;18) de células B de linfomas (Youle, 2008). La familia Bcl-2 está constituida por miembros reguladores de la vía mitocondrial de la apoptosis, los cuales pueden ser pro-apoptóticos o anti-apoptóticos. Los miembros pro-apoptóticos clásicos son Bak y Bax, la localización mitocondrial de Bak y Bax resulta en la formación de un poro en la membrana mitocondrial que permite la salida del citocromo c. Los miembros anti-apoptóticos que antagonizan la función de Bak y Bax son, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, MCL1 y A1 (Cory, 2003; Lessene, 2008).

Los miembros de esta familia comparten cuatro dominios conservados de homología con Bcl-2, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, además de un dominio transmembranal (Figura 8), éste último le sirve a los miembros que lo poseen para anclarse al retículo endoplásmico o a las membranas mitocondrial

y nuclear cuando no existe actividad apoptótica. El subgrupo de proteínas que sólo poseen el dominio BH3 - Bim, BID, PUMA, Noxa, Bad, BMF, HRK y Bik - tienen actividad pro-apoptótica y su actividad se da por la unión directa a los miembros anti-apoptóticos de la misma familia, con lo que se produce un cambio conformacional y la inhibición de la actividad de estas proteínas (Letai, 2002; Youle, 2008). La expresión de los miembros del dominio BH3 es regulada por la actividad transcripcional o por el procesamiento post-traducciona en respuesta a diferentes señales de muerte (Lessene, 2008).

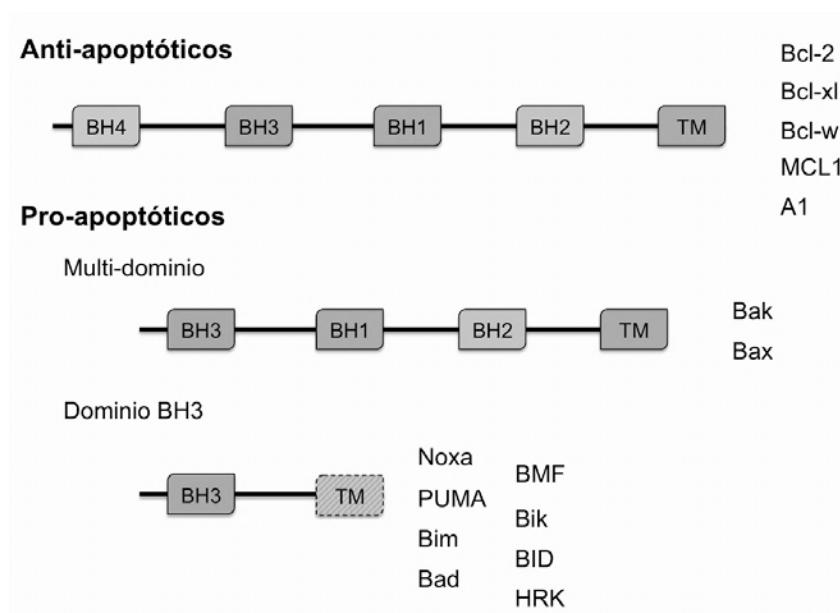


Figura 8. Miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 poseen al menos uno de los cuatro dominios de homología compartida con Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4), algunos miembros también poseen un dominio transmembranal (TM). Los miembros anti-apoptóticos poseen los cuatro dominios BH. Los miembros pro-apoptóticos carecen del dominio BH4, y se dividen en los multi-dominio o los que sólo poseen el dominio BH3. Los miembros que sólo poseen el dominio de homología BH3 pueden tener o no, el dominio TM (Adaptado de Yip, 2008).

6.1 Noxa

La proteína Noxa consta de 54 aa, pesa aproximadamente 6 kDa, y es codificada por el gen PMAIP1 (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*) que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 18 (Lessene, 2008). Esta proteína es un miembro del subgrupo que sólo posee el dominio BH3 de la familia de proteínas Bcl-2, la cual induce la apoptosis celular mediante la inactivación de los miembros anti-apoptóticos MCL1 y A1 de la

misma familia de proteínas. Noxa compete contra Bak, Bim y Bcl-2 por la unión de MCL1, desplazando a estas proteínas del sitio de unión a MCL1 (Lessene, 2008; Youle, 2008).

La acción de Noxa sobre las proteínas MCL1 y A1 se realiza mediante un cambio conformacional por la unión selectiva de la secuencia del dominio BH3, que actúa como ligando para la secuencia receptora de los dominios BH1-BH2-BH3 de MCL1 (Yip, 2008;). Así mismo, la unión de Noxa a la proteína MCL1 promueve la fosforilación y la consecuente degradación proteosomal de la proteína anti-apoptótica (Nakajima, 2014). La degradación de MCL1 por Noxa genera de manera indirecta la activación de la proteína pro-apoptótica Bak, la cual promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial y la salida del factor apoptótico citocromo c para la formación del apoptosoma (Dengler, 2014).

La expresión de Noxa es dependiente de la vía de señalización de p53, por lo tanto, una gran variedad de estímulos de la activación de p53 promueven la expresión de Noxa (Cory, 2003;). Algunos de los estímulos de la expresión de Noxa son la inanición de glucosa, el daño al ADN, la radiación, y la presencia de material genético viral (Huang, 2000; Roos, 2006; Lessene, 2008).

6.2. PUMA

La proteína moduladora de la apoptosis sobreexpresada por p53, mejor conocida como PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) está constituida por 193 aa, con un peso aproximado de 20 kDa y codificada por el gen BBC3 (*Bcl-2 Binding Component 3*) localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (Lessene, 2008).

PUMA es una proteína inductora de la apoptosis que pertenece al subgrupo de la familia Bcl-2 que sólo posee el dominio de homología BH3. Esta proteína tiene una doble función en la regulación positiva de la apoptosis, puede actuar inhibiendo a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, MCL1 y A1, mediante una interacción selectiva y cambio conformacional por la unión de su dominio BH3 a los dominios de funcionales de estas proteínas

(Lessene, 2008; Youle, 2008), o bien, activando por medio del dominio pro-apoptótico de las proteínas Bak y Bax mediante unión y un cambio conformacional con su dominio BH3 (Korsmeyer, 2000; Yu, 2003; Chipuk, 2009).

La expresión de PUMA está regulada por la actividad de factores de transcripción en respuesta a diversos estímulos de muerte, incluyendo la actividad citotóxica de fármacos antineoplásicos, y el estrés por el mal plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (Bean, 2013; Yu, 2009). A diferencia de otros miembros del subgrupo del dominio BH3, la proteína PUMA puede ser expresada de manera independiente de la señalización de la vía de p53, o en células p21^{-/-}, por tal motivo se le considera como un potente inductor de la apoptosis en células cancerosas que presentan evasión de la muerte celular por inhibición de p53 (Cory, 2003, Gómez-Lazaro, 2008; Yu, 2009).

7. Snail

La proteína Snail es el miembro más representativo de la familia de proteínas del mismo nombre. La familia Snail cuenta con una región C-terminal altamente conservada que posee entre cuatro y seis motivos estructurales de dedos de zinc del tipo Cis_2His_2 , los cuales permiten estabilizar la interacción de las proteínas de esta familia con el ADN, el ARN y otras proteínas; además en la región N-terminal poseen un dominio divergente Snail/Gfi (SNAG) que es indispensable para la actividad transcripcional (Manzanares, 2001; Nieto, 2002).

Snail está constituida por 264 aa, su peso aproximado es de 29 kDa y es codificada por el gen Snai1, localizado en el brazo largo del cromosoma 20. Esta proteína funciona como un regulador transcripcional que inhibe la expresión de genes ectodérmicos dentro del mesodermo, por lo tanto se le considera un regulador clave para el desarrollo y mantenimiento del mesodermo durante el desarrollo embrionario (Hemavathy, 2000; Peiro, 2006). Snail induce la transición epitelio-mesénquima (TEM) mediante la unión a la

caja-E con motivo 5'-CANNTG-3' de los promotor de Vimentina y Fibronectina, con lo que favorece su transcripción, y mediante la unión al promotor de E-caderina para inhibir su transcripción (Cano, 2000; Zhu, 2012; Wang, 2013).

Estudios realizados en cáncer han demostrado que la sobreexpresión de Snail podría estar vinculada con la progresión tumoral, la evasión de la muerte celular, y la metástasis, ya que esta proteína puede alterar los niveles de expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y de la apoptosis. Algunas de estas proteínas son ATM, PTEN, p21, Bcl-2, y PUMA (Kurrey, 2009; Wu, 2010).

En cuanto a la apoptosis, Snail puede evadir este proceso en las células tumorales mediante la inhibición transcripcional de las proteínas inductoras de muerte celular. Algunas de las proteínas descritos sobre las que actúa Snail son: la proteína ATM que activa la vía de p53, la proteína PTEN que inhibe la vía de sobrevivencia PI3K/AKT, y la proteína PUMA que permeabiliza la membrana mitocondrial e inhibe a los miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Estas proteínas pueden ser inhibidas debido a que poseen el motivo blanco de Snail (5'-CANNTG-3') en las cajas-E de sus promotores (Wu, 2005; Kurrey, 2009).

La expresión de Snail puede darse a nivel transcripcional mediante diversos estímulos, como los del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- κ B), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Además, Snail puede ser regulado de manera negativa a nivel post-transcripcional por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), que fosforila a Snail para promover su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal (Julien, 2007; Wang, 2013; Bonavida, 2013).

8. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas pertenecientes a la familia de los corticosteroides. Los principales efectos fisiológicos de los glucocorticoides son, el aumento en la actividad de la gluconeogénesis y glucogenogénesis hepática, el incremento del catabolismo de proteína en el músculo esquelético, el aumento en la degradación de lípidos y la formación de tejido adiposo, así como la disminución de la respuesta inflamatoria e inmunológica del organismo (Gennaro, 2003; Mendoza, 2008).

8.1 Biosíntesis de los glucocorticoides

La síntesis y secreción de los glucocorticoides se da principalmente en la zona fasciculada de la glándula suprarrenal, aunque también pueden ser sintetizados de *novo* en varios tejidos, incluyendo órganos linfoides primarios, el intestino, la piel y el cerebro (Taves, 2011).

La biosíntesis de los glucocorticoides en la glándula suprarrenal comienza con el transporte del colesterol circulante al interior de la mitocondria mediante lipoproteínas transportadoras. Dentro de la mitocondria se realiza la escisión de la cadena lateral del colesterol por la enzima citocromo P450_{scc} (*side-chain cleavage*, CYP11A1), con este cambio estructural se forma el metabolito precursor de 21 átomos de carbono, la pregnenolona. Las conversiones esteroideas de la pregnenolona son realizadas por diferentes miembros de la familia del citocromo P450 para dar origen a los distintos glucocorticoides (Figura 9) (Davies, 2003; Mendoza, 2008; Taves, 2011).

Las glucocorticoides recién sintetizadas son unidos a una proteína llamada globulina de unión a corticosteroides (*corticosteroid-binding globulin*, CBG) para aumentar su solubilidad y ser transportados al citosol o a sus células blanco (Lin, 2010).

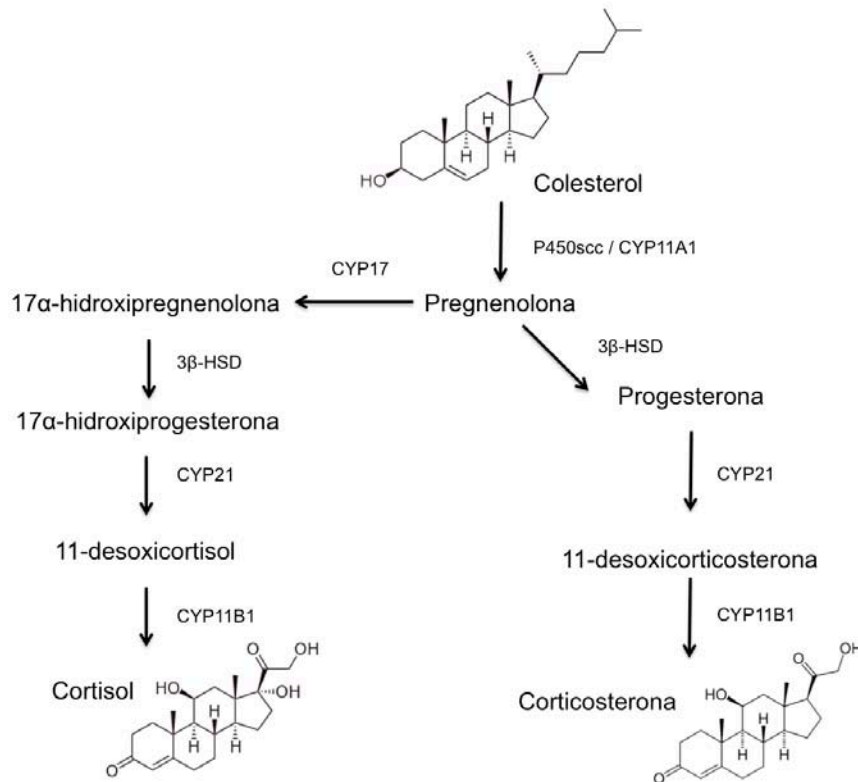


Figura 9. *Biosíntesis de los glucocorticoides.* La síntesis de las hormonas esteroideas en la zona fasciculada de la glándula suprarrenal comienza con el colesterol. El colesterol sufre cambios estructurales mediante una serie de reacciones enzimáticas generadas por miembros de la familia del citocromo P450 (CYP), los cambios estructurales dan origen a los glucocorticoides. El cortisol y la corticosterona son los principales glucocorticoides sintetizados por la glándula suprarrenal (Adaptado de Taves, 2011).

8.2 Glucocorticoides y cáncer

Los glucocorticoides se introdujeron en la terapia del cáncer como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de leucemias, ya que estas hormonas actúan como inductores de apoptosis en células linfoides (Frei, 1965; Gaynon, 1995). Sin embargo, en otro tipo de células, los glucocorticoides producen efectos contrarios e inhiben la apoptosis inducida por una variedad de estímulos como la señalización de receptores de muerte del tipo $\text{TNF}\alpha$ y Fas, la falta de nutrientes y la acción de algunos agentes quimioterapéuticos (Schmidt, 2004; Zhang, 2006).

A pesar de esto, los glucocorticoides siguen siendo usados en el tratamiento del cáncer de tumores sólidos por su eficacia en la reducción y prevención de distintos efectos adversos como la inflamación, el dolor, el

desequilibrio electrolítico, el edema tumoral relacionado, las náuseas, y el vómito, todos estos causados por los agentes quimioterapéuticos (Rutz, 2002; Rutz, 2004).

8.3. Dexametasona

La DEX es un glucocorticoide sintético que posee un átomo de flúor en el C₉ y un grupo metilo en el C₁₆, estos cambios estructurales le proporcionan mayor estabilidad, un tiempo de vida media más largo, mayor afinidad hacia su receptor, y efectos farmacológicos más prolongados en comparación con los glucocorticoides naturales (Figura 11) (Meikle, 1977; Inaba, 2010).

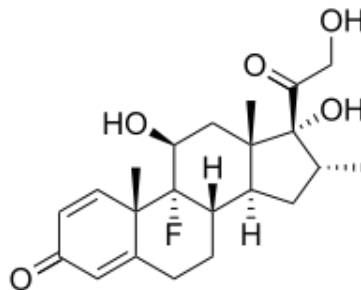


Figura 10. Estructura molecular de la dexametasona. Representación estructural del glucocorticoide sintético dexametasona.

La DEX se utiliza ampliamente en el tratamiento del cáncer para prevenir las náuseas y el vómito producidos por la quimioterapia (Cassileth, 1983; Roila, 1998; Jordan, 2005).

8.4 Receptor de glucocorticoides

Los glucocorticoides ejercen sus efectos a través de la regulación transcripcional de genes sensibles a esteroides. La actividad transcripcional de los glucocorticoides es mediada por el receptor de glucocorticoides (*glucocorticoid receptor*, GR), un miembro de la familia de receptores hormonales nucleares (Schaaf, 2003).

El receptor de glucocorticoides requiere asociarse a un glucocorticoide para ser activado y translocado al núcleo en forma de un complejo receptor-ligando,

una vez en el núcleo, el complejo se une en forma de dímero a los elementos de respuesta a glucocorticoides, los cuales se encuentran en la región promotora de los genes blanco de los glucocorticoides (Figura 10), (Schoneveld, 2004; Gross, 2009). La unión del complejo dimérico a los elementos de respuesta puede iniciar o reprimir la expresión de genes de manera directa, mediante el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, o la remodelación de la cromatina (Collingwood, 1999; Schaaf, 2003).

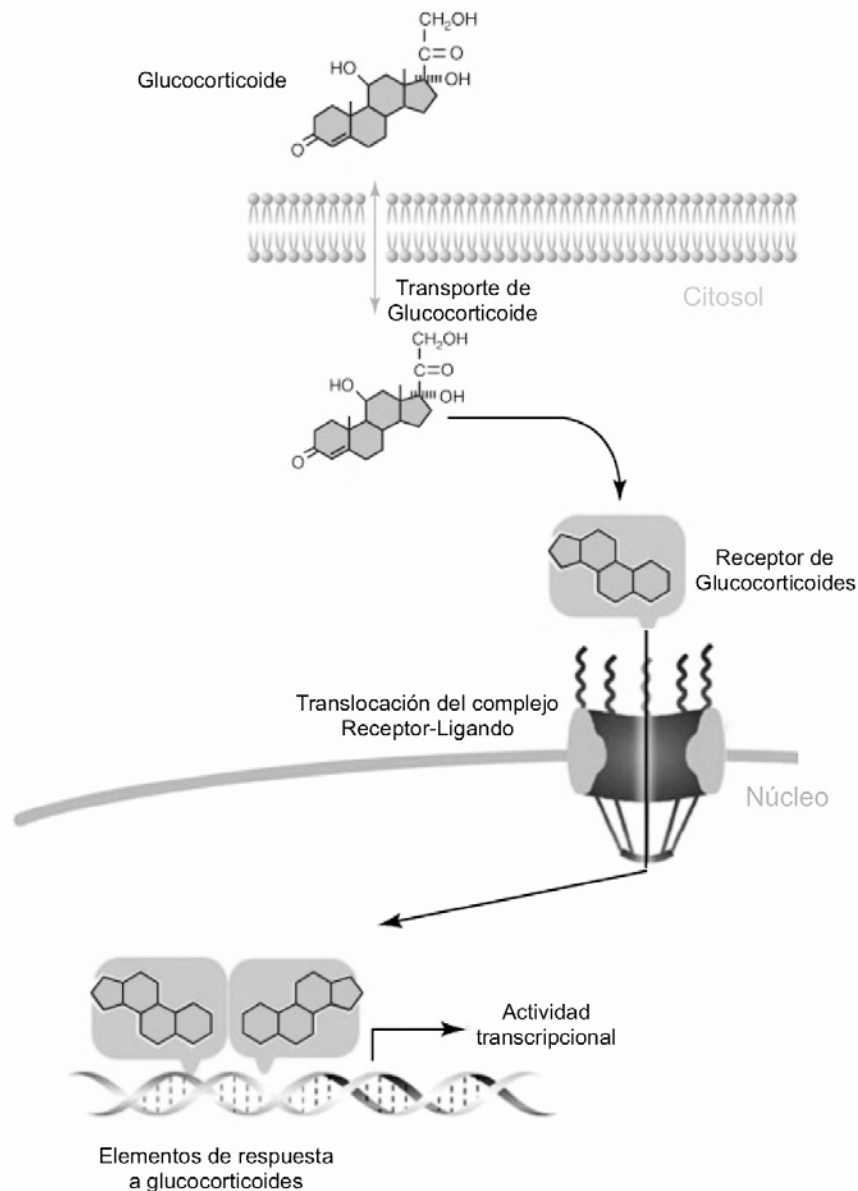


Figura 11. Señalización del receptor de glucocorticoides. Esquematación de la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides. El receptor de glucocorticoides se transloca al núcleo después de la unión a su ligando, donde puede unirse en forma de dímero a los elementos de respuesta para iniciar o reprimir la transcripción de los genes blanco de los glucocorticoides (Modificado de Moutsatsou, 2012).

III. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado los mecanismos de evasión de la muerte celular de las células cancerosas. Uno de estos mecanismos, es el asociado al uso de los glucocorticoides en la quimioterapia, ya que se ha reportado que los glucocorticoides inhiben la muerte celular inducida por diferentes agentes quimioterapéuticos. Para estudiar este mecanismo se propuso como modelo de estudio las células HeLa, a las cuales se les aplicaron estímulos con el glucocorticoide sintético DEX y/o el agente antienoplásico CP.

Los resultados previos han demostrado que la DEX protege a las células HeLa de la apoptosis inducida por el CP de manera dosis dependiente, ya que cuando las células fueron tratadas con la DEX y el CP (DEX/CP), se observó un aumento en la viabilidad celular, y una menor cantidad de núcleos apoptóticos respecto a las células tratadas únicamente con el CP, y éstos efectos fueron mayores conforme se aumentó la concentración del estímulo de la DEX (Figura 12).

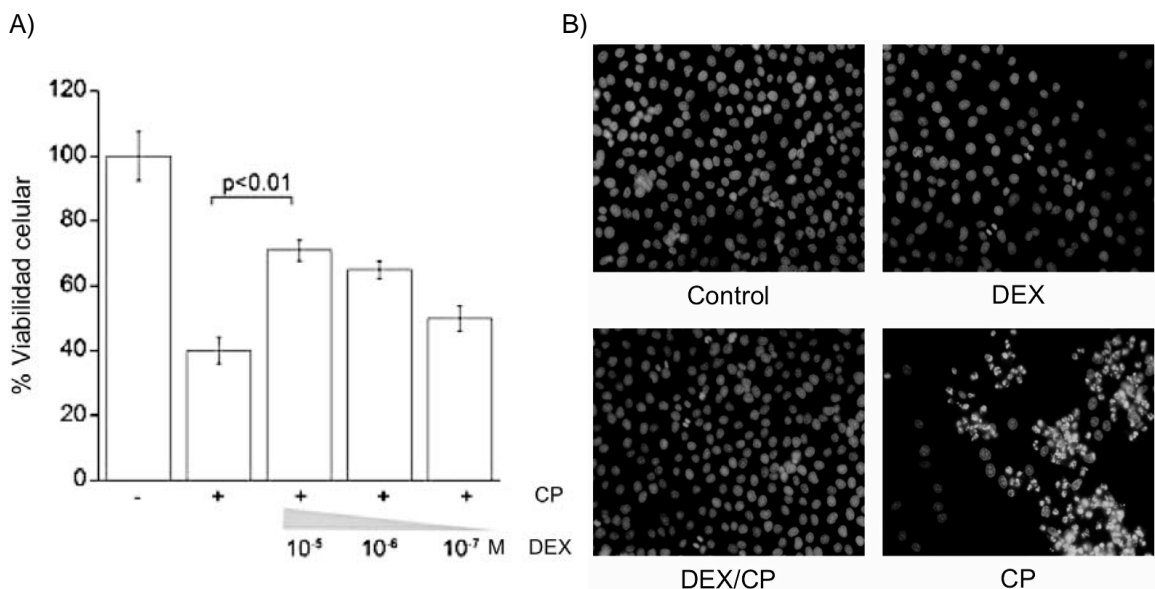


Figura 12. Efecto de la DEX en la apoptosis de las células HeLa. La DEX aumenta la viabilidad celular y protege la integridad de los núcleos de las células HeLa durante la apoptosis inducida por el CP. A) Las células HeLa fueron tratadas con distintas concentraciones de DEX (1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} M), y un estímulo de CP (40 μ M). La viabilidad celular fue determinada después de 24 h de tratamiento. B) Se realizó la tinción con bromuro de etidio de los núcleos de las células HeLa después de finalizados los tratamientos con DEX 1×10^{-5} M y CP 40 μ M.

Adicionalmente, se demostró que el efecto protector de la DEX es mayor cuando se aplica como un tratamiento previo al estímulo del CP, y que dicho efecto es directamente proporcional al tiempo de exposición del estímulo con la DEX (Figura 13).

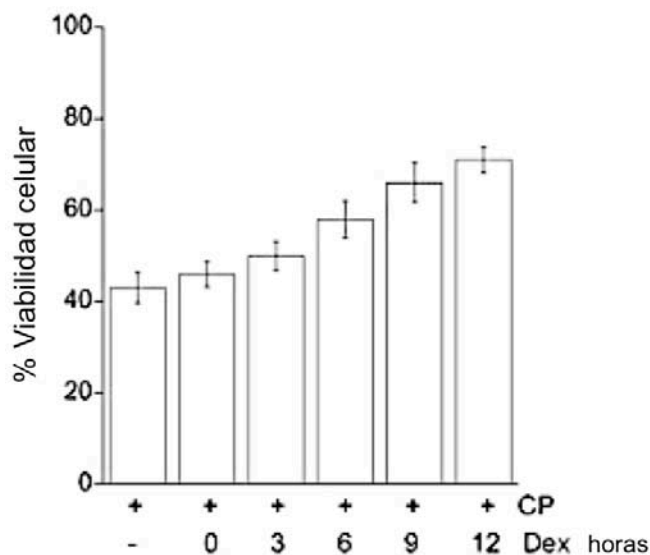


Figura 13. Viabilidad de las células HeLa expuestas el tratamiento con DEX/CP. La células HeLa fueron tratadas con DEX 1×10^{-5} M durante 0, 3, 6, 9, y 12 h previas al estímulo de CP 40 μ M. La viabilidad celular fue determinada después de 12 h de exposición al estímulo con CP.

Por otra parte, para evaluar el proceso de la apoptosis inducido por el CP, se analizó el daño al ADN en las células HeLa, donde se observó que el tratamiento previo con la DEX al estímulo del CP no disminuye el daño al ADN (Figura 14), lo que indica que a pesar de que la DEX protege de la apoptosis a las células HeLa, no evita el daño al ADN generado por el CP.

Otro de los eventos estudiados como parte de la apoptosis fue la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, donde ensayos de medición del potencial de membrana demostraron que la DEX no reduce la permeabilización de la mitocondria durante la apoptosis inducida por el CP, por lo que tampoco disminuye la salida desde la mitocondria de las proteínas inductoras de la apoptosis como el citocromo c (Imagen no mostrada).

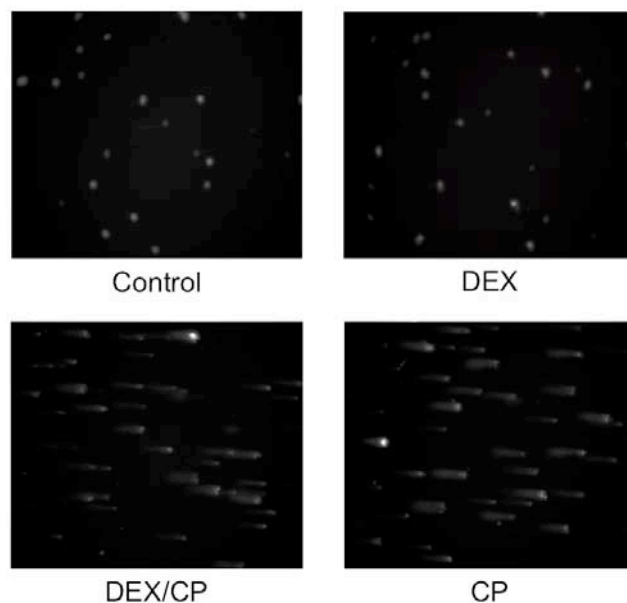


Figura 14. *Integridad del ADN de las células HeLa durante los tratamientos con DEX y/o CP.* Se realizaron ensayos cometa de las células HeLa tratadas con DEX 1×10^{-5} M, durante 12 h (DEX); células pretratadas 12 h con DEX 1×10^{-5} M y estímulo de CP 40 μ M durante 12 h (DEX/CP); y de células con estímulo de CP 40 μ M durante 12 h (CP).

Considerando los argumentos anteriores, se propuso que el efecto de la DEX podría deberse a la modulación de la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis, las cuales podrían presentar un perfil de expresión relacionado con la evasión de la apoptosis en las células HeLa tratadas con DEX. Por lo tanto, se decidió evaluar los niveles de expresión de Noxa y PUMA, dos miembros del subgrupo BH3 de la familia de proteínas Bcl-2 relacionados con la inducción de la apoptosis, y de Snail, una proteína de unión al ADN que posee actividad transcripcional, la cual se ha vinculado con la sobrevivencia de células cancerosas, durante los tratamientos con DEX y/o CP en las células HeLa.

IV. JUSTIFICACIÓN

La acción farmacológica de los agentes quimioterapéuticos se fundamenta en la inducción de la muerte celular, sin embargo, las terapias actuales no son dirigidas específicamente hacia las células cancerosas, lo cual genera una gran variedad de efectos adversos por la acción citotóxica de los agentes antineoplásicos en las células normales del organismo (Rutz, 2004; Bruce, 2005; Masui, 2013).

En la clínica, la DEX es un glucocorticoide sintético ampliamente usado para controlar y reducir las náuseas y el vómito causados por los efectos citotóxicos de la quimioterapia (Jordan, 2005). Por otra parte, existe evidencia de que la DEX inhibe la muerte de las células cancerosas en diversos tipos de tumores sólidos, y el mecanismo molecular por el cual realiza este efecto sigue siendo en gran parte desconocido (Gassler, 2005; Chen, 2010; Ge, 2012; Hou, 2013). Así mismo, dada la capacidad de adaptación de las células cancerosas, parece probable que la inhibición de la muerte celular seguirá siendo un problema clínico importante, incluso para el área de las terapias dirigidas y los tratamientos (Garraway, 2012; Holohan, 2013).

El estudio de los cambios en la expresión de proteínas reguladoras del proceso de apoptosis inducidos por los glucocorticoides puede permitir establecer las bases del mecanismo molecular implicado en la resistencia a la quimioterapia, así como fundamentar el uso racional de la DEX en la terapia contra el cáncer (Zhang, 2006; Fulda, 2006).

V. OBJETIVOS

-

1. Objetivo general

Determinar la participación de Noxa, PUMA y Snail en el efecto protector de la dexametasona en la apoptosis inducida por el cisplatino en las células HeLa.

2. Objetivos particulares

- i. Determinar la dosis letal media (DL₅₀) del cisplatino en las células HeLa.
- ii. Evaluar el efecto de la dexametasona ante la apoptosis inducida por el cisplatino en la línea celular HeLa.
- iii. Analizar los niveles del ARNm de Noxa, PUMA y Snail en las células HeLa con tratamiento de dexametasona y/o cisplatino.
- iv. Analizar los niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail en las células HeLa con tratamiento de dexametasona y/o cisplatino.
- v. Evaluar la expresión y localización del receptor de glucocorticoides en las células HeLa con tratamiento de dexametasona y/o cisplatino.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Línea celular

HeLa. Línea celular humana derivada de adenocarcinoma de cérvix [Número: ATCC CCL-2]. Esta línea celular contiene el virus del papiloma humano tipo 18.

2. Cultivo celular

Las células HeLa se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

3. Dosis letal media del cisplatino

Para determinar la dosis letal media (DL₅₀) del agente antineoplásico CP, se sembraron 15,000 células HeLa por pozo en placas de 48 pozos con 300 µL de medio de cultivo. Después de 24 h de cultivo, las células se expusieron a las siguientes concentraciones del CP: 40, 45, y 50 µM a diferentes tiempos de exposición. Los tiempos establecidos para los estímulos fueron 12, 18, y 24 h; cada tratamiento se comparó con un control (células sin tratamiento) y se realizó por triplicado en tres experimentos independientes. La viabilidad celular se determinó con el método de cristal violeta, posteriormente descrito.

4. Viabilidad celular (técnica del Cristal Violeta)

La viabilidad celular se determinó por la técnica del cristal violeta. Terminados los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado de las células remanentes con buffer fosfato salino (PBS) al 1X, las células fueron fijadas con etanol al 70% a -20°C durante 10 min y posteriormente se tiñeron con 300 µL cristal violeta al 1% en agua, dejándolo actuar durante 15

min El colorante fue retirado mediante lavados continuos con agua. Finalmente la tinción de las células viables se retiró disolviendo el colorante con ácido acético al 33%. La absorbancia se determinó por espectrofotometría con lectura a 570nm.

5. Esquemas de tratamiento con DEX y/o CP

5.1 Efecto de la DEX en la apoptosis inducida por el CP

Para determinar el efecto protector de la DEX en la apoptosis inducida por el CP, se sembraron 15,000 células HeLa por pozo, en placas de 48 pozos. Después de 12 h, se añadió el estímulo de la DEX a una concentración de 1×10^{-5} M, durante 24 h, con recambio del estímulo a las 12 h. Finalizado el tratamiento de la DEX, se aplicaron los estímulos del CP a una concentración de 40 μ M durante 18 h. Terminados los tratamientos, se determinó la viabilidad celular de las células HeLa con la técnica del cristal violeta (Figura 15).

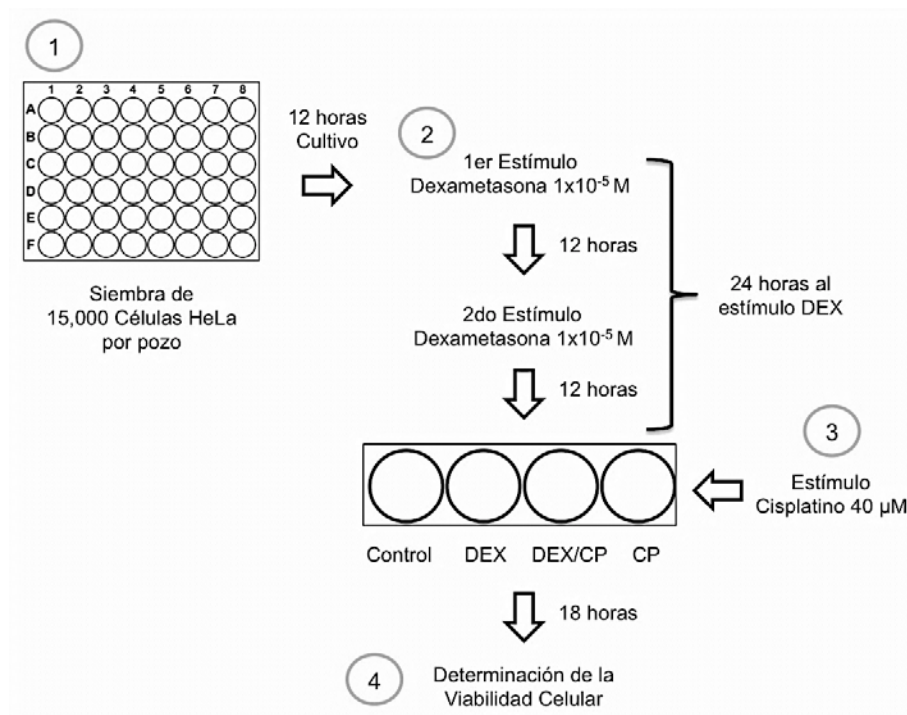


Figura 15. Esquema de tratamiento para la evaluación del efecto de la DEX en la apoptosis inducida por CP. Esquema de los tratamientos para evaluar la inhibición con DEX de la apoptosis inducida con CP en las células HeLa.

5.2. Análisis de los niveles de expresión del ARNm

Para establecer el tiempo de exposición a los estímulos donde se identificara un cambio representativo en la expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail, se sembraron 70,000 células HeLa por caja, en 24 cajas de cultivo de 100 mm de diámetro. El total de las cajas se dividió en 6 grupos, cada uno correspondiente a un tiempo distinto de exposición de las células al estímulo del CP: 0, 3, 6, 9, 12 y 18 h. Los grupos estuvieron conformados por 4 cajas, cada una correspondiente a los estímulos del esquema de tratamiento de las células HeLa: células sin estímulo (Control), DEX 1×10^{-5} M (DEX); DEX 1×10^{-5} M y CP $40 \mu\text{M}$ (DEX/CP); y CP $40 \mu\text{M}$ (CP). Concluidos los tiempos de exposición al estímulo del CP, se extrajo el ARN total de las células y se realizó el análisis de la expresión del ARNm mediante PCR semicuantitativo (Figura 16).

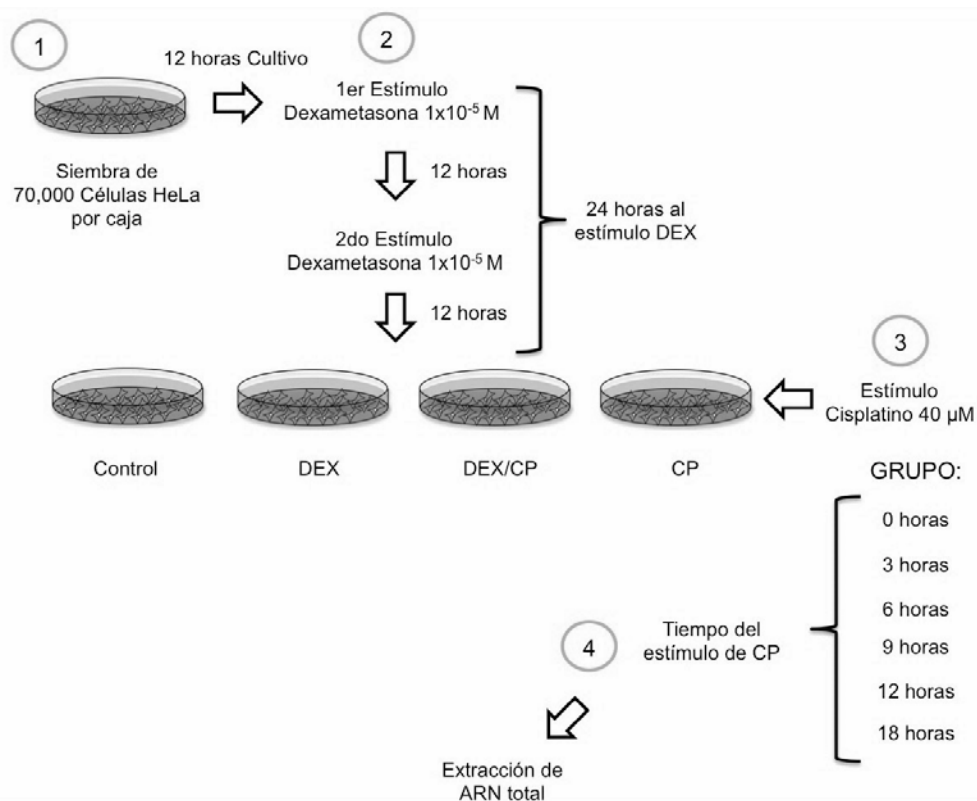


Figura 16. Esquema de tratamiento para el análisis de la expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail. Esquema de los tiempos de exposición a los tratamientos con DEX y/o CP en las células HeLa para evaluar la expresión de Noxa, PUMA y Snail.

6. Extracción de ARN total

El ARN total de las células en tratamiento se extrajo con trizol y cloroformo. Las células se homogenizaron con solución de lisis QIAzol[®], posteriormente se añadió cloroformo y se centrifugó, la fase acuosa se precipitó con isopropanol, finalmente el botón obtenido se disolvió en agua-dietilpirocarbonato. La pureza del ARN extraído se comprobó con la relación 260/280 por análisis y cuantificación con el NanoDrop.

7. Síntesis de ADN complementario

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). La síntesis se efectuó a partir de 1 µg de ARN total, en un volumen final por reacción de 25 µL, en el cual se añadieron hexámeros sintetizados al azar, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), la ribonucleasa RNaseOUT[™] y la enzima transcriptasa reversa termoestable SuperScript[®] III (*Life Technologies*[™]) en buffer con MgCl₂. El ARN se desnaturalizó a 65°C durante 10 min. Posteriormente el tubo de reacción se incubó por 10 min a 25°C y por 60 min a 42°C, la reacción se terminó con una incubación de 5 min a 85°C.

8. Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar el ADNc se utilizaron los siguientes reactivos: dNTPs, buffer, iniciadores específicos para el gen de interés (Tabla 2), y la enzima ADN polimerasa termoestable. Las condiciones para los ensayo fueron las siguientes: 2.5 unidades de la polimerasa AmpliTaq Gold[®] (*Applied Biosystems*), 2 mM de dNTPs, 10 µM de cada iniciador, buffer de reacción con MgCl₂ en 1.5 µM y la cantidad de ADNc correspondiente a la normalización de cada muestra en un volumen final de 25 µL por reacción. Los ciclos de reacción y las temperaturas de alineación (T_m) para los iniciadores se determinaron mediante el diseño de los oligos. La expresión del ARNm se

normalizó con la expresión de la Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (GAPDH). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Tabla 2. Especificaciones de los oligos empleados			
Oligos	Secuencia	Temperatura de alineación (T _m)	Peso molecular (pb)
Noxa	Sentido 5'-TCATGGGTGCCCTTGAAAC-3'	60.5°C	264
	Antisentido 5'-CCAGCCGCCAGTCTAATCA-3'	61.9°C	
PUMA	Sentido 5'-TCCTGTGCTCTGCCCGTGAC-3'	64.5°C	253
	Antisentido 5'-ACAGCAGCGCATATACAGTA-3'	56.8°C	
Snail	Sentido 5'-CCTGCTGGCAGCCATCCCAC-3'	65.9°C	126
	Antisentido 5'-TCCTGGAGCCGAAGGGAGGC-3'	65.9°C	
GAPDH	Sentido 5'-CCCCTTCATTGACCTCAACT-3'	54.6°C	400
	Antisentido 5'-TTGTCATGGATGACCTTGGC-3'	55.4°C	

8.1 Análisis de los niveles de expresión de Noxa, PUMA y Snail

Después de establecido el tiempo de 12 h de exposición al estímulo del CP como el tiempo representativo en los cambios de expresión de Noxa, PUMA y Snail, se realizó un nuevo esquema de tratamiento para correlacionar los niveles de expresión del ARNm con los niveles de proteínas. Para esto se sembraron 8 cajas de cultivo de 100 mm de diámetro con 70,000 células HeLa por caja. La mitad de las cajas se emplearon para la obtención del ARN total, y la otra mitad de las cajas se empleó para la extracción de proteínas totales. Los tratamientos aplicados a las cajas fueron: células sin estímulo (Control), DEX 1×10^{-5} M (DEX); DEX 1×10^{-5} M y CP 40 μ M (DEX/CP); y CP 40 μ M (CP). Después de concluidas las 12 h de exposición al estímulo del CP, se extrajo el ARN total y las proteínas totales. Posteriormente, se realizó el análisis de la expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail mediante PCR semicuantitativo, y se realizó el análisis de la expresión de las proteínas mediante la técnica de WB (Figura 17).

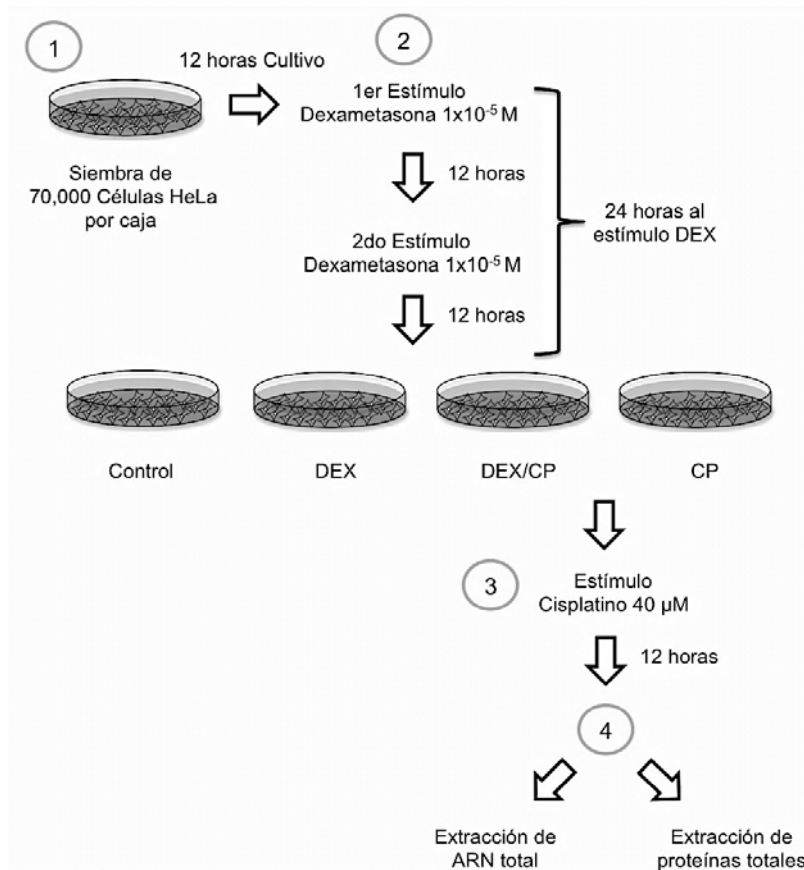


Figura 17. Esquema de tratamiento para el análisis de los niveles de expresión de *Noxa*, *PUMA* y *Snail*. Esquema de tratamiento para el análisis del ARNm y la correlación con los niveles de proteína de *Noxa*, *PUMA* y *Snail* en las células HeLa con tratamientos de DEX y/o CP.

9. Extracción de proteínas totales

Las proteínas de las células en tratamiento se obtuvieron mediante lisis celular y precipitación con solución RIPA® (*Sigma-Aldrich*), posteriormente con centrifugación se separaron los restos celulares. El sobrenadante con las proteínas fue recolectado y almacenado a -20°C .

10. Western blot

Para realizar el análisis de proteínas por WB se elaboraron geles de acrilamida al 18% y se colocaron $15\ \mu\text{g}$ de proteínas, correspondientes a cada uno de los tratamientos. Los geles se corrieron en cámaras de electroforesis verticales y se transfirieron a membranas de PVDF por un método semihúmedo. Las membranas fueron bloqueadas con solución de TBS-Tween

al 1%. Los anticuerpos primarios de las proteínas Noxa, PUMA, Snail y GAPDH, se incubaron durante 12 h a 4°C; mientras que los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2h a temperatura ambiente. El pegado inespecífico de los anticuerpos se retiró con TBS-Tween mediante lavados de 5 min cada uno durante 1 hora. Las especificaciones y las concentraciones empleadas de los anticuerpos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Condiciones de los anticuerpos empleados en WB					
Anticuerpo primario	Peso molecular	Isotipo	Concentración empleada	Anticuerpo secundario	
				Hospedero	Concentración
Anti-Noxa (Calbiochem®)	10 kDa	IgG ₁	0.5 µg/1mL	Ratón	0.5 µg/1mL
Anti-PUMA (Calbiochem®)	23 kDa	IgG	0.6 µg/1mL	Conejo	0.5 µg/1mL
Anti-Snail (Active Motif®)	32 kDa	IgG _{2a}	1.0 µg/1mL	Rata	0.5 µg/1mL
Anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology®)	35 kDa	IgG	0.5 µg/1mL	Conejo	0.5 µg/1mL

11. Inmunocitoquímica

Para determinar la expresión y localización subcelular del GR en las células en tratamiento se realizó inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para el receptor. Para ello, después de 12 horas de exposición a los tratamientos, las células se fijaron sobre cubreobjetos con paraformaldehído al 2% en PBS. Las células fijadas se lavaron con PBS 1X, la peroxidasa endógena de las células se inactivó con peróxido de hidrógeno al 3%, y se bloqueó el marcaje inespecífico con albúmina al 1% en PBS-Triton durante 1 h. El anticuerpo primario se incubó durante 2 h, el anticuerpo secundario biotilado y acoplado a peroxidasa se incubó durante 1 h, y el complejo avidina-biotina se incubó durante 30 min, todos ellos incubados a temperatura ambiente.

El revelado de los cubreobjetos con células se realizó con 3,3'-diaminobezidina tetrahidrocloruro (DAB) al 1%. Las especificaciones, la concentración empleada de los anticuerpos y el tiempo de revelado se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Condiciones del anticuerpo empleado en Inmunicitoquímica		
Anticuerpo primario	Concentración empleada	Tiempo de exposición (DAB)
Anti-GR (<i>Santa Cruz Biotechnology</i> ®)	0.75 µg/1mL	45 segundos

VII. RESULTADOS

1. Dosis letal media (DL₅₀) del cisplatino.

El CP es un agente alquilante que genera daño al ADN, lo cual promueve la detención del ciclo celular e inducción de la muerte celular (González, 2001; Ge, 2012). Para evaluar su efecto citotóxico y determinar su dosis letal media, se expusieron las células HeLa a diferentes concentraciones del CP durante distintos tiempos de exposición.

El CP disminuyó la viabilidad de las células HeLa en todas las concentraciones y a los tiempos de exposición analizados (Gráfica 1). El mayor efecto sobre la viabilidad celular se observó con la concentración de 50 μM , existiendo una disminución del 74.78% después de 24 h de exposición. Por otra parte, el menor efecto se observó con la concentración de 40 μM después de 12 h de exposición, obteniéndose una disminución del 21.28% en la viabilidad celular. El análisis de los resultados permitió determinar que el efecto del CP en la viabilidad de las células HeLa es dosis-tiempo dependiente. La DL₅₀ del CP, establecida en las células HeLa, fue de 40 μM a 18 h de exposición, la cual se empleó en los experimentos posteriores.

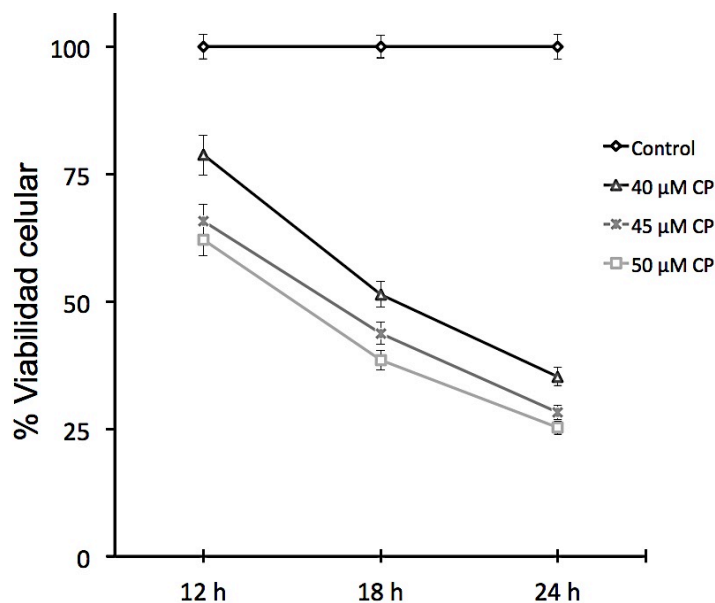


Figura 18. Viabilidad de las células HeLa expuestas al CP. Las células HeLa fueron tratadas con distintas concentraciones de CP (40 μM , 45 μM y 50 μM) y comparadas con un control de células sin tratamiento. La viabilidad celular fue determinada a las 12, 18, y 24 h de exposición a cada concentración.

2. Efecto protector de la DEX en la apoptosis inducida por el CP.

La DEX es ampliamente usada en pacientes con cáncer para aliviar los síntomas causados por la quimioterapia, tales como el dolor, inflamación, náuseas, vómito, falta de apetito y el desequilibrio electrolítico (Rutz, 2004; Jordan, 2005). Sin embargo, existen varios reportes que vinculan la resistencia a una amplia variedad de agentes citotóxicos utilizados en el tratamiento del cáncer, con un pretratamiento con DEX en diversos tipos de células cancerosas procedentes de tumores no hematológicos (Gassler, 2005; Chen, 2010; Ge, 2012; Hou, 2013).

Para evaluar si el pretratamiento con la DEX presenta un efecto protector en la apoptosis inducida por el CP en las células HeLa, se expusieron las células a los siguientes estímulos: dexametasona (DEX); dexametasona y cisplatino (DEX/CP) y cisplatino (CP). El estímulo de la DEX se aplicó a una concentración de 1×10^{-5} M y como pretratamiento de 24 h a la aplicación del estímulo con CP.

Las células tratadas solamente con CP presentaron una disminución en la viabilidad celular del 57.82%, lo cual se esperaba de acuerdo con el efecto citotóxico de dicho fármaco y su DL_{50} establecida. Cuando se aplicó el pretratamiento con la DEX, la pérdida de la viabilidad celular en las células HeLa producida por el CP fue menor, ya que en las células con el tratamiento de DEX/CP se obtuvo un porcentaje mayor de viabilidad, 66.83%. Por otra parte, las células HeLa que sólo recibieron el estímulo de la DEX presentaron una disminución en la viabilidad celular del 13.78% respecto al control, sin embargo, este valor no se reflejó como un efecto de la muerte celular, si no como una medida de la inhibición del crecimiento celular por la DEX (Gráfica 2). El análisis de los resultados indicó que el efecto protector de la dexametasona ante la apoptosis inducida por el CP en las células HeLa es estadísticamente significativo.

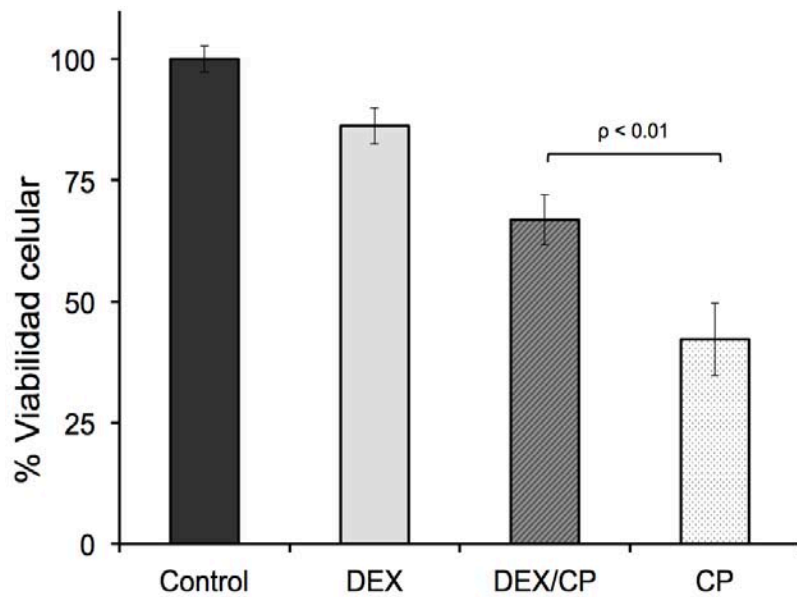


Figura 19. Viabilidad de las células HeLa en los tratamientos con DEX y/o CP. Las células HeLa se trataron con DEX 1×10^{-5} M durante 24 h (DEX), pretratamiento de 24 h con DEX 1×10^{-5} M y CP $40 \mu\text{M}$ (DEX/CP), y CP $40 \mu\text{M}$ (CP). La viabilidad celular se determinó después de 18 h de exposición al CP. Se graficaron los valores correspondientes a tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos con una $p < 0.01$.

3. Análisis morfológico de la apoptosis.

Para examinar si el efecto de la DEX y el CP en la viabilidad de las células HeLa es debido a la inhibición o a la inducción de la apoptosis respectivamente, se evaluó la morfología de las células en tratamiento, ya que este tipo de muerte se caracteriza por cambios morfológicos específicos como la reducción del tamaño celular, la condensación y la fragmentación del material nuclear, la formación de vesículas en la membrana plasmática, y la pérdida de la adherencia mediante la matriz extracelular hacia otras células (Kerr, 1972; Ameisen, 2002; Ouyang, 2012).

Las células tratadas únicamente con el CP presentaron en su mayoría una morfología apoptótica, la cual se identificó a partir del cambio a una forma esférica y la disminución en el tamaño celular, la condensación de los núcleos y la formación de cuerpos apoptóticos en forma de vesículas. El número de células con morfología apoptótica fue menor en las células en las que se aplicó el tratamiento de DEX/CP, lo cual corrobora el porcentaje de viabilidad mayor en estas células respecto a las tratadas sólo con el CP. Por último, en las

células tratadas únicamente con DEX no se identificó la presencia de cuerpos apoptóticos, lo que indica que la disminución en la viabilidad de estas células no se asocia a un efecto de apoptosis, si no a un efecto de inhibición del crecimiento celular por acción de la DEX, ya que el número de células totales fue menor respecto al control (Figura 18). Estos resultados confirman el efecto de inhibición con DEX del proceso apoptótico inducido por el CP en las células HeLa.

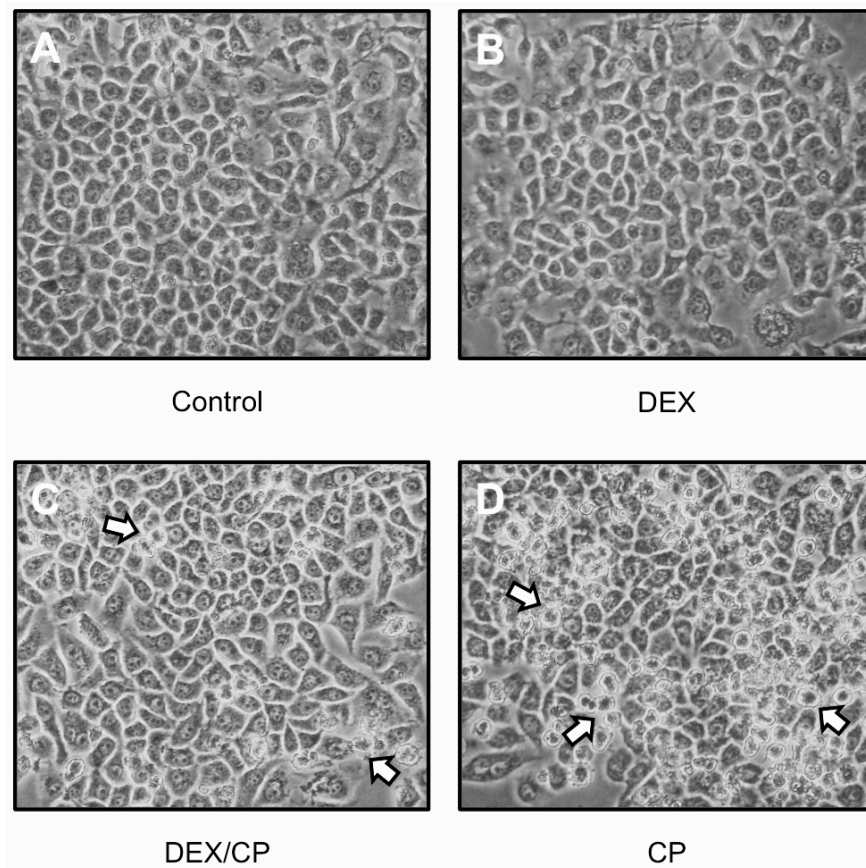


Figura 20. *Morfología de las células HeLa ante los diferentes estímulos.* Microscopía representativa de la formación de los cuerpos apoptóticos de las células HeLa durante los tratamientos con DEX y/o CP. A) Células sin tratamiento; B) Células con estímulo de DEX 1×10^{-5} M durante 24 h; C) Células pretratadas 24 h con DEX 1×10^{-5} M y estímulo de CP $40 \mu\text{M}$ durante 18 h; D) Células con estímulo de CP $40 \mu\text{M}$ durante 18 h. Las flechas señalan algunos de los cuerpos apoptóticos formados.

Una vez determinado el efecto protector con la DEX de la apoptosis inducida por el CP en las células HeLa, y demostrado dicho efecto en la viabilidad celular y el análisis morfológico de las células en tratamiento, se analizaron los niveles de expresión a nivel de ARNm de Noxa, PUMA y Snail durante distintos tiempos de exposición a los estímulos con DEX y/o CP.

4. Estandarización de los oligos de amplificación.

Para poder evaluar la expresión a nivel de ARNm de las proteínas reguladoras del proceso de apoptosis, Noxa, PUMA y Snail mediante la técnica de PCR, se realizó la estandarización de los oligos específicos para estos genes a partir del ajuste en la temperatura de alineación (T_m) y el número de ciclos de reacción. Adicionalmente, se realizó la estandarización de los oligos para el gen constitutivo GAPDH, con el cuál se normalizó la expresión de Noxa, PUMA y Snail.

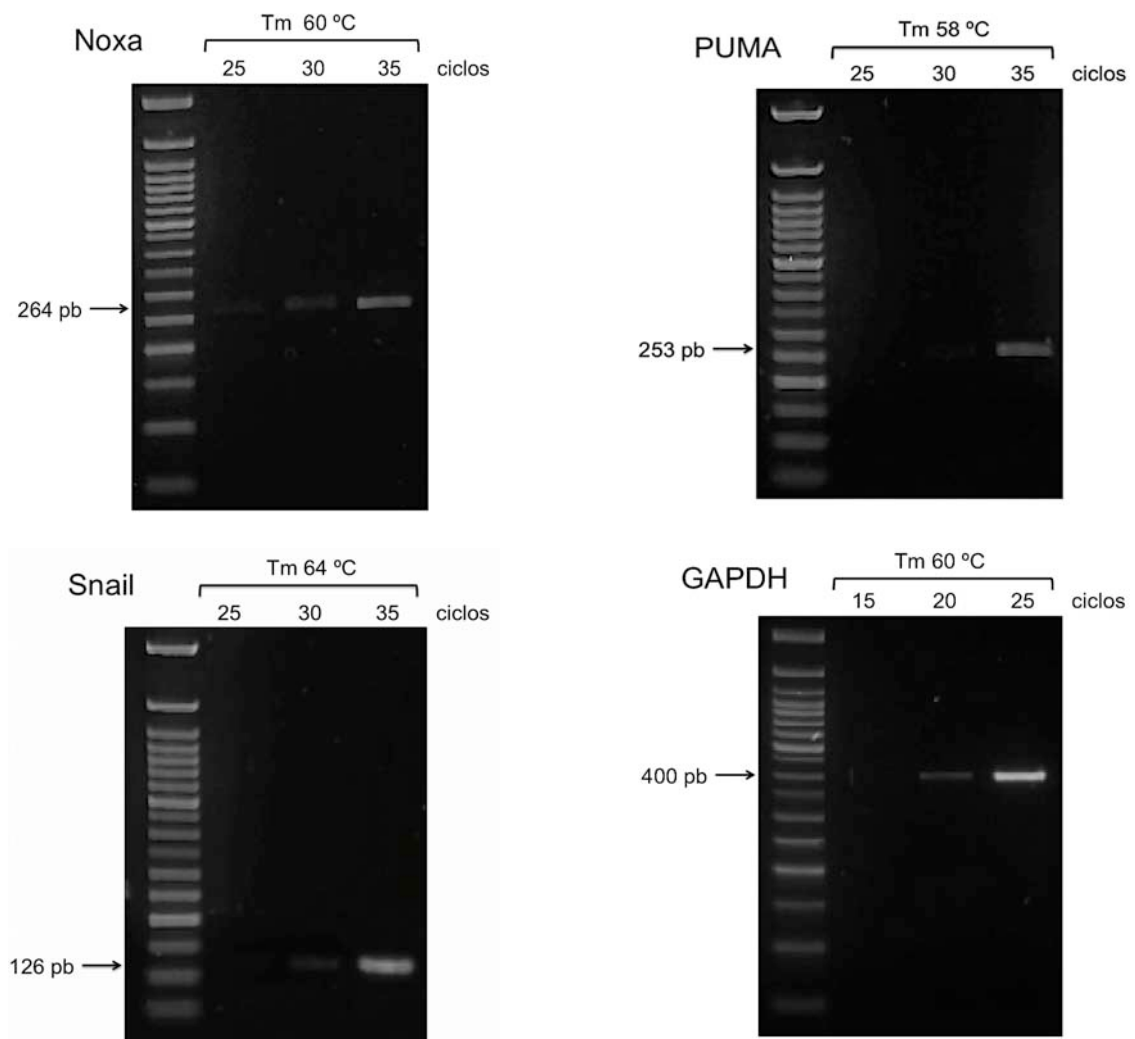


Figura 21. Estandarización de los oligos de amplificación. Imagen de los geles de agarosa al 2% con los productos de amplificación de los fragmentos de Noxa (264 pb), PUMA (253 pb), Snail (126 pb), y GAPDH (400 pb). Se muestran los productos a diferentes ciclos de reacción y a la temperatura de alineación establecida para cada uno. En el carril de la izquierda se observa el marcador de peso molecular con bandas de múltiplos de 50 pb.

Se obtuvieron los productos de PCR de 25, 30 y 35 ciclos de reacción para los oligos de Noxa, PUMA y Snail, y los de 15, 20 y 25 ciclos de reacción para GAPDH. La amplificación de los fragmentos se confirmó mediante el peso molecular e intensidad de la banda en el gel (Figura 19).

En la siguiente tabla se muestran las condiciones de amplificación establecidas de la estandarización de los oligos de Noxa, PUMA, Snail, y GAPDH, las cuales se emplearon para la evaluación de su expresión a nivel de ARNm mediante la técnica de PCR.

Tabla 5. Condiciones de la estandarización de amplificación de los oligos			
Oligos	Temperatura de alineación (Tm)	Ciclos de reacción	Peso molecular (pb)
Noxa	60°C	32	264
PUMA	58°C	32	253
Snail	64°C	32	126
GAPDH	60°C	20	400

5. Niveles de expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail.

Después de establecidas las condiciones de amplificación para el ARNm de Noxa, PUMA, y Snail, se realizó un ensayo exploratorio para evaluar la expresión de estos genes durante los tratamientos con DEX y/o CP (Figura 20), donde se observó un aumento representativo en los niveles de expresión del ARNm de Noxa en el intervalo de 9 a 12 h de exposición a los tratamientos con DEX/CP y CP. Por otra parte, la expresión a nivel de transcrito de PUMA presentó dos aumentos, el primero y más representativo a las 3 h de exposición a los tratamientos, y un segundo en el intervalo de 9 a 12 h, principalmente en los tratamientos con DEX y DEX/CP. Finalmente, la expresión de Snail presentó un aumento a las 3 y a las 12 h de exposición al estímulo del CP y un aumento a las 12 h con el tratamiento de DEX/CP.

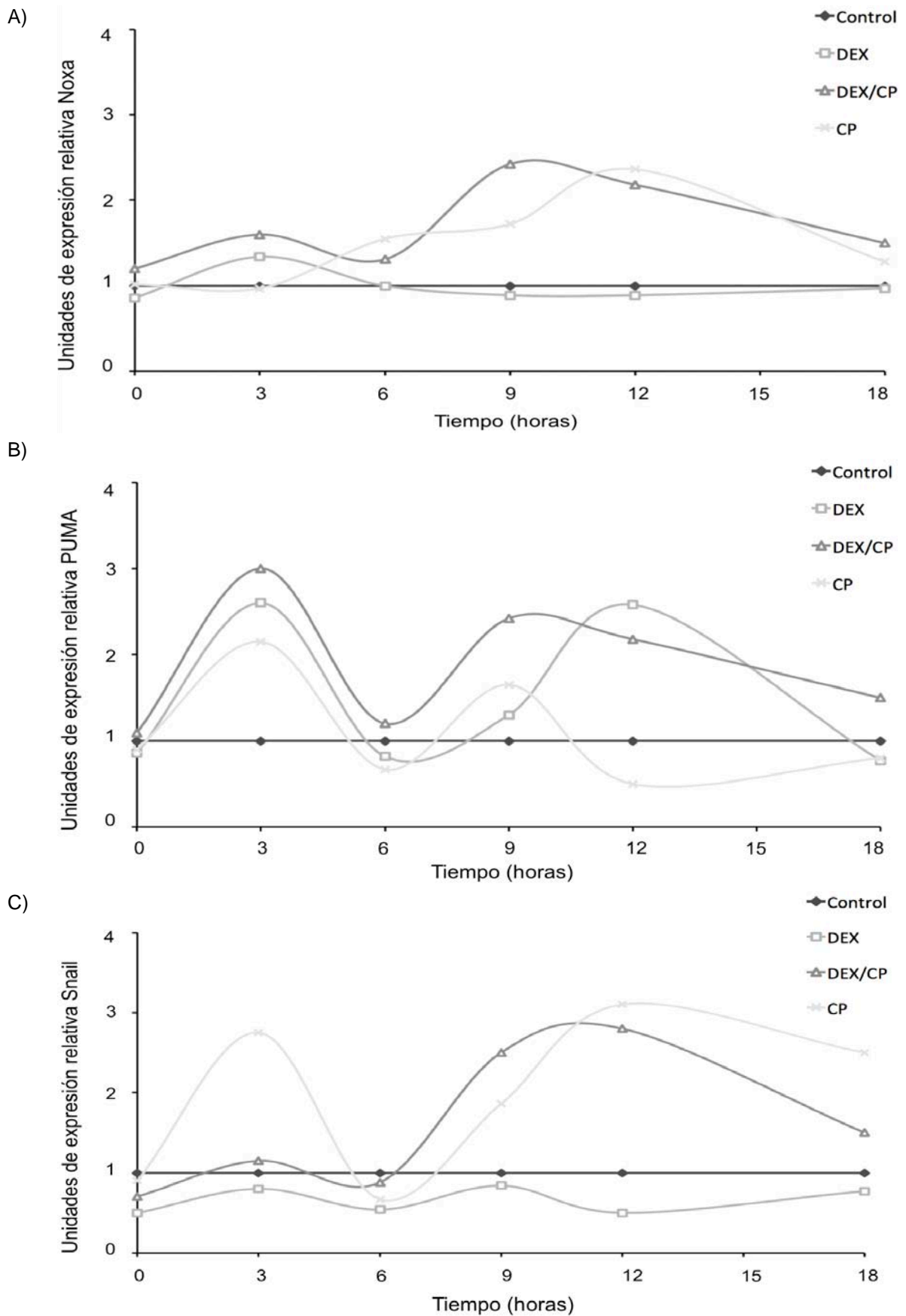


Figura 22. Expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail durante los tratamientos con DEX y/o CP. Las células HeLa fueron tratadas con DEX 1×10^{-5} M durante 24 h (DEX), DEX 1×10^{-5} M durante 24 h y CP 40 μ M durante 18 h (DEX/CP), y CP 40 μ M durante 18 h (CP). Se determinó la expresión a nivel de ARNm de A) Noxa, B) PUMA y C) Snail durante distintos tiempos de exposición al estímulo del CP.

Debido a que el tiempo de 12 h de exposición a los tratamientos fue constante en los aumentos en los niveles de expresión de Noxa, PUMA y Snail, se decidió volver a analizar a este tiempo, los cambios en la expresión del ARNm para corroborar la expresión de los transcritos con la expresión de las proteínas en las células HeLa con tratamiento.

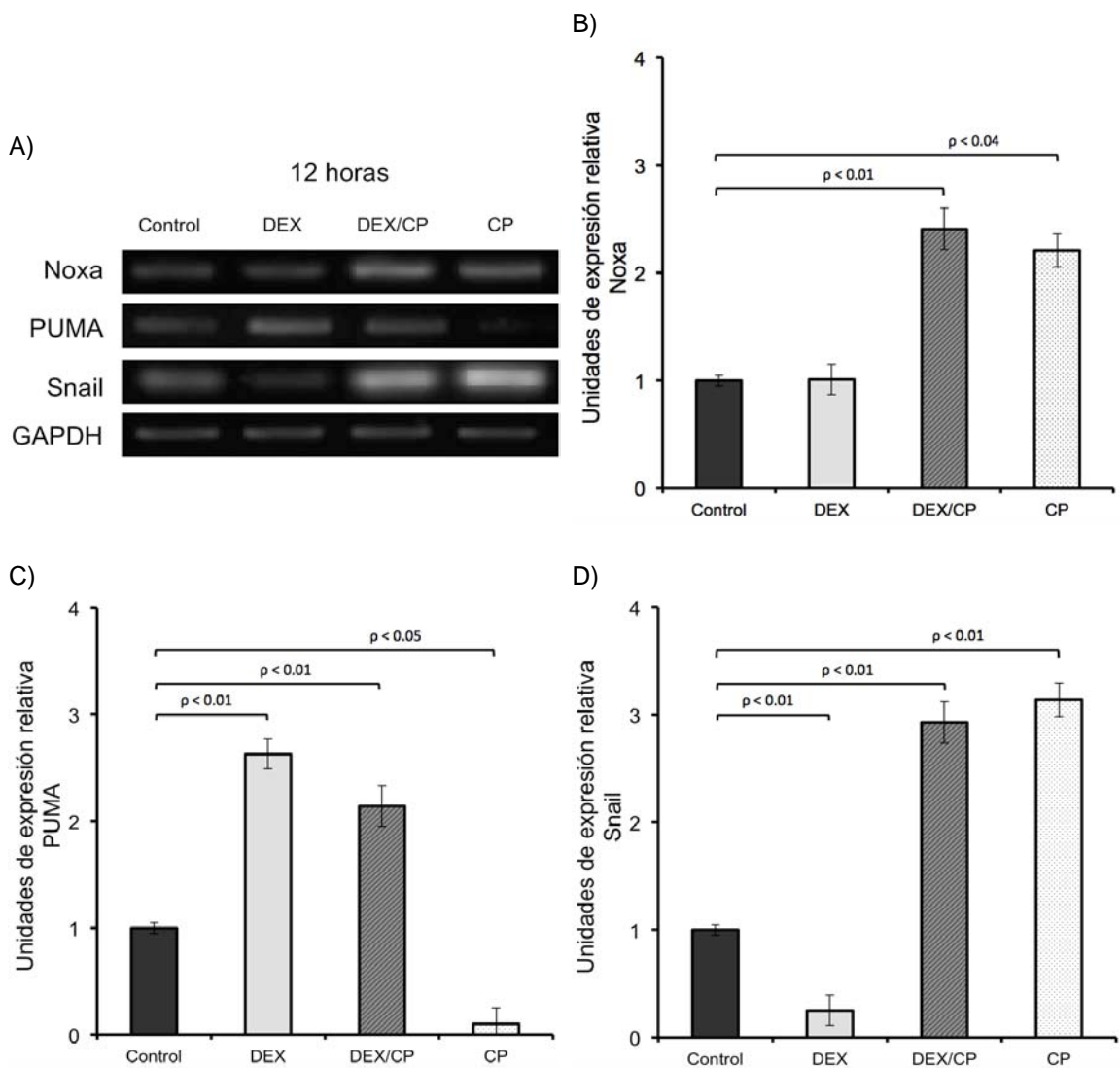


Figura 23. Niveles de expresión del ARNm de Noxa, PUMA y Snail a las 12 h de tratamiento. Las células HeLa fueron tratadas con DEX 1×10^{-5} M durante 24 h (DEX), DEX 1×10^{-5} M durante 24 h y CP 40 μ M durante 12 h (DEX/CP), y CP 40 μ M durante 12 h (CP). A) Imagen del gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación de los genes en cada uno de los tratamientos después de 12 h del estímulo del CP. Las gráficas muestran los niveles de expresión del ARNm de B) Noxa, C) PUMA, y D) Snail en los tratamientos después de 12 h del estímulo del CP. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos con una $p < 0.05$.

Las células tratadas únicamente con la DEX presentaron un aumento en los niveles de expresión de PUMA y una disminución en la expresión de Snail,

mientras que en las células tratadas únicamente con el estímulo del CP se observó un aumento en la expresión de Noxa y Snail, y una disminución en la expresión de PUMA (Figura 21). Además, se puede observar que el tratamiento con DEX/CP aumentó los niveles de expresión de estos genes respecto al control, presentándose el mayor aumento en la expresión del ARNm de Snail, seguido del de Noxa y finalmente, PUMA.

Una vez establecida la expresión de Noxa, PUMA y Snail, se determinó si los cambios a nivel del ARNm se mantenían al nivel de las proteínas.

6. Niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail.

El análisis de la expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail se realizó mediante WB a las 12 h de exposición a los tratamientos.

Las células tratadas únicamente con la DEX presentaron un aumento en los niveles de expresión de las proteínas Noxa y PUMA, mientras que los niveles de Snail disminuyeron con este tratamiento. Por otra parte, las células expuestas al estímulo del CP presentaron un aumento en la expresión de Noxa y Snail, y los niveles de expresión de la proteína PUMA se encontraron disminuidos respecto al control. Finalmente el tratamiento con DEX/CP aumentó los niveles de expresión de las proteínas analizadas, aumentándose en mayor proporción la expresión de Noxa y Snail respecto a su control (Figura 22).

Como parte de la relación de los niveles de expresión de Noxa, PUMA y Snail y la actividad del glucocorticoide DEX en las células HeLa, se decidió evaluar la localización celular del receptor de glucocorticoides en las células en tratamiento.

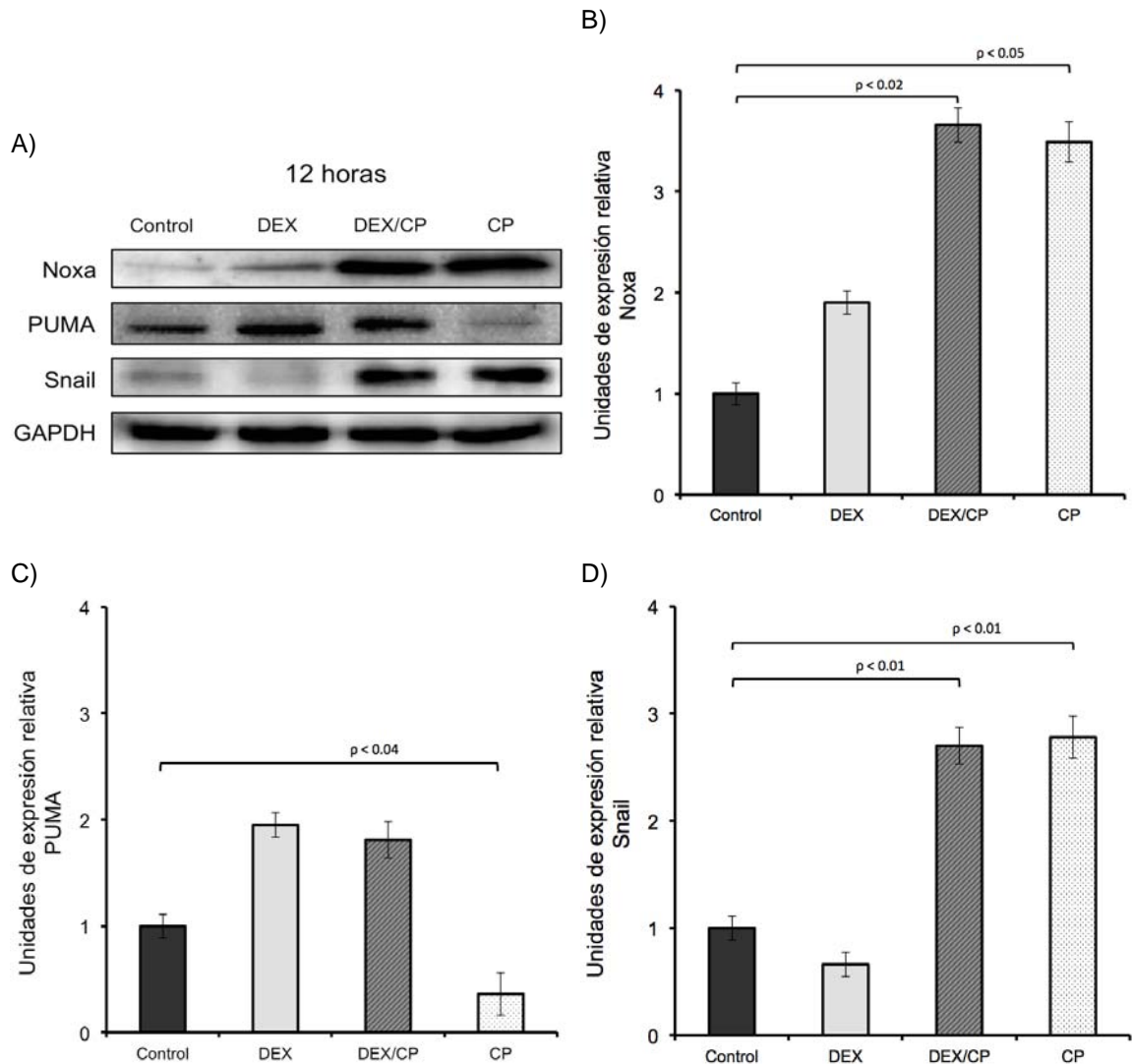


Figura 24. Niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail a las 12 h de tratamiento. Las células HeLa fueron tratadas con DEX 1×10^{-5} M durante 24 h (DEX), DEX 1×10^{-5} M durante 24 h y CP 40 μ M durante 12 h (DEX/CP), y CP 40 μ M durante 12 h (CP). A) Imagen del gel de acrilamida al 18% con las proteínas Noxa, PUMA y Snail en los tratamientos después de 12 h del estímulo del CP. Las gráficas muestran los niveles de expresión de las proteínas B) Noxa, C) PUMA, y D) Snail en los tratamientos después de 12 h del estímulo del CP. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos con una $p < 0.05$.

7. Localización celular del receptor de glucocorticoides.

La actividad de los glucocorticoides está mediada por la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR). La asociación del receptor de glucocorticoides a su ligando promueve su activación y su consecuente translocación al núcleo, donde al unirse a los elementos de respuesta a glucocorticoides, en forma de dímero, regula la actividad transcripcional de distintos genes blanco (Schaaf, 2003; Gross, 2009).

Para evaluar si el efecto de la DEX en los niveles de expresión de las proteínas Noxa, PUMA y Snail de las células HeLa pudiera relacionarse con la actividad transcripcional del GR, se decidió determinar la localización del receptor de glucocorticoides en las células en tratamiento a las 12 h de exposición a los estímulos.

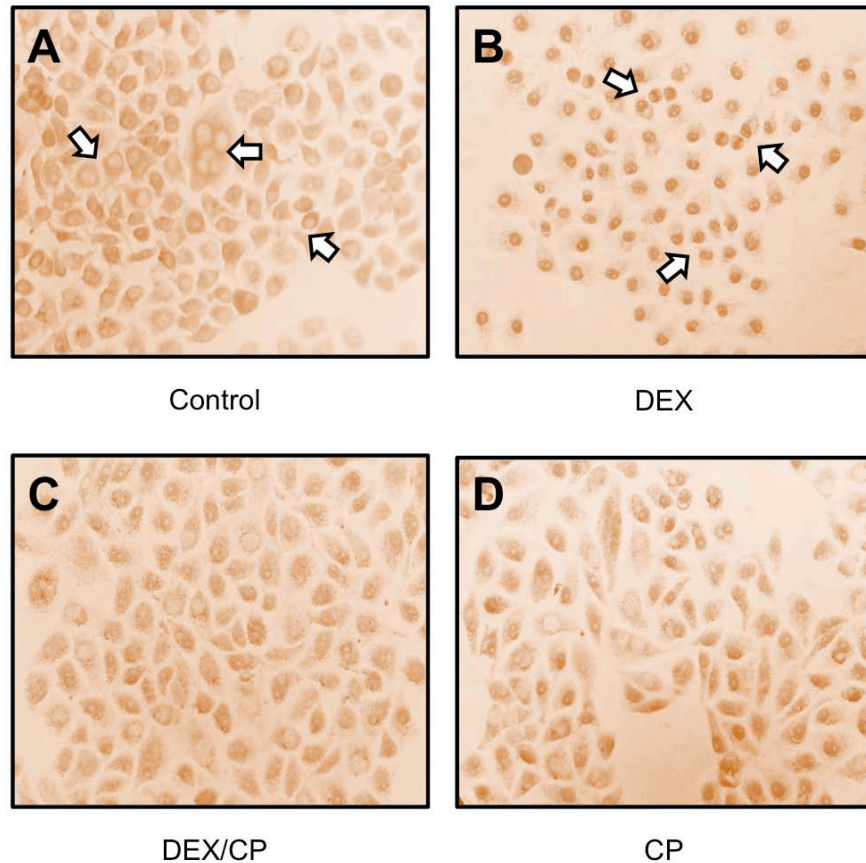


Figura 25. Expresión y localización celular del receptor de glucocorticoides a las 12 h de tratamiento. Microscopia representativa de la expresión y localización celular del receptor de glucocorticoides en las células HeLa durante los tratamientos con DEX y/o CP. A) células sin tratamiento; B) células con estímulo de DEX 1×10^{-5} M durante 24 h; C) células pretratadas 24 h con DEX 1×10^{-5} M y estímulo de CP 40 μ M durante 12 h; D) células con estímulo de CP 40 μ M durante 12 h. Las flechas señalan la expresión del GR en los núcleos de las células en tratamiento.

Las células control mostraron una abundante expresión del GR y una localización del receptor en la región citoplasmática, mientras que, en las células tratadas con el estímulo de la DEX se observó la expresión y localización del GR en los núcleos de las células, lo que sugiere la activación y translocación del receptor de glucocorticoides por la unión con la DEX (Figura 23). Sin embargo, las células tratadas con DEX/CP y CP, mostraron una localización del receptor en ambos compartimientos celulares, siendo la localización nuclear la más abundante en ambos tratamientos.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de los glucocorticoides en la terapia contra el cáncer sigue siendo frecuente, pues presentan una gran eficacia en la reducción y prevención de los efectos adversos generados por los agentes quimioterapéuticos (Rutz, 2002; Rutz, 2004). Bajo esta premisa, la DEX es el glucocorticoide sintético más ampliamente usado contra las náuseas y el vómito asociados a la quimioterapia (Jordan, 2005). Sin embargo, diversos estudios han reportado que la DEX inhibe la apoptosis inducida por diferentes estímulos de muerte en células de cáncer de tiroides (Petrella, 2006), pulmón (Gassler, 2005; Ge, 2012), cérvix (Kamradt, 2000; Herr, 2003), ovario (Chen, 2010; Hou, 2013) y mama (Messmer, 2001).

En nuestro estudio, los ensayos de viabilidad celular en los tratamientos con DEX y/o CP mostraron que las células HeLa tratadas únicamente con DEX disminuyeron su crecimiento en un 13.78%, esto podría deberse a un mecanismo similar al reportado en células de carcinoma de pulmón, donde se demostró la acumulación de células en fase G1/G0 del ciclo celular, asociada con la hipofosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb), y con la disminución de la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas 2 y 4 (Cdk2, Cdk4) (Greenberg, 2002). Por otra parte, las células HeLa tratadas con DEX durante 24 h previas al estímulo del CP presentaron un incremento significativo en la viabilidad celular (66.83%) respecto a las células tratadas únicamente con el CP (42.18% de células viables). Aunado al aumento de la viabilidad celular generado con un pretratamiento de 24 h con la DEX, cabe señalar que en las células tratadas con DEX/CP se observó una reducción en la condensación y fragmentación de los núcleos, y una disminución en la formación de cuerpos apoptóticos respecto a las células tratadas con CP. En conjunto, estos resultados confirman el efecto protector de la DEX en la apoptosis inducida por el CP en las células HeLa.

Aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual los glucocorticoides inhiben la apoptosis en las células cancerosas, existen en la literatura varios reportes que sugieren una relación entre miembros de la familia de proteínas Bcl-2 y el efecto de la DEX en el proceso de apoptosis. En células de cáncer de hígado y de ovario se ha reportado una correlación entre la disminución de la tasa de apoptosis y la regulación de los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL (Yang, 2011; Hou, 2014). De igual manera, en células de leucemias linfoblásticas, se ha asociado la resistencia a la apoptosis inducida por los glucocorticoides con la regulación antagónica entre la proteína pro-apoptótica BIM y la proteína anti-apoptótica Bcl-2, donde la sobreexpresión de Bcl-2 estaría inhibiendo la activación del complejo apoptótico mitocondrial Bak/Bax (Melarangi, 2012; Jing, 2015).

El análisis de los perfiles de expresión de las proteínas reguladoras del proceso de apoptosis de la familia Bcl-2, Noxa y PUMA, así como el de la proteína de unión al ADN vinculada con la sobrevivencia de las células cancerosas, Snail, podrían contribuir al conocimiento de su participación en el o los mecanismos moleculares de resistencia a la apoptosis asociada con los glucocorticoides. Los resultados del curso temporal de la expresión a nivel de ARNm mostraron que en las células HeLa, el estímulo de la DEX no modificó la expresión de Noxa. Esto podría coincidir con algunos reportes, donde se descarta la participación de Noxa en la resistencia a la apoptosis inducida por glucocorticoides, hecho posiblemente asociado con la regulación de la expresión del miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2, MCL1 y/o el estado de fosforilación del receptor de glucocorticoides (GR) (Erlacher, 2005; Lynch, 2010). Así mismo, el estímulo de la DEX mostró una disminución en la expresión de Snail independiente del tiempo de exposición al tratamiento. Este hallazgo podría explicarse a partir del trabajo de Zhang y cols. (2010), donde se vinculó la activación del GR por DEX con la disminución en la expresión de Snail, esto a partir de la demostración de la interacción del GR con los elementos de la caja E del promotor de E-caderina para inhibir la formación del complejo Snail/E-caderina y promover la inhibición de la expresión de Snail.

IX. CONCLUSIONES

- Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) del CP en las células HeLa, estableciéndose en 40 μ M CP durante 18 h de exposición.
- El pretratamiento de 24 h con DEX 1×10^{-5} M inhibió el proceso de apoptosis inducido por el CP en las células HeLa.
- Los perfiles de expresión a nivel de transcrito de Noxa, PUMA y Snail compartieron un aumento después de 12 h de exposición al estímulo del CP.
- Las proteínas Noxa, PUMA y Snail no se relacionaron con la inhibición de la apoptosis mediada por la DEX en las células HeLa.
- El estímulo con DEX en las células HeLa promovió la translocación del receptor de glucocorticoides al núcleo, mientras que el estímulo del CP produjo una disminución en la expresión y localización nuclear del GR.

X. PERSPECTIVAS

- Realizar el esquema de tratamiento con DEX y CP en diferentes líneas de células tumorales para comparar los perfiles de expresión proteicos obtenidos en el modelo de las células HeLa, y así confirmar el papel de Noxa, PUMA y Snail en el proceso de inhibición de la apoptosis mediado por la DEX.
- Determinar el efecto de la DEX en un modelo *in vivo* y comparar los resultados con lo obtenido de manera *in vitro*.
- Evaluar el papel del receptor de glucocorticoides en la regulación transcripcional de Noxa, PUMA y Snail u otras proteínas involucradas en el proceso de apoptosis.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameisen JC. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **9**, 367-393.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Rev Can* **2**, 420-430.
- Ashkenazi A. (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 325–331.
- Bai L, Wang S. (2014) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* **53**, 615-627.
- Bailly-Maitre B, de Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J, Rahmani R. (2001) Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ* **3**, 279-288.
- Bean GR, Ganesan YT, Dong Y, Takeda S, Liu H, Chan PM, Huang Y, Chodosh LA, Zambetti GP, Hsieh J, Cheng E. (2013) PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis. *Sci Signal* **6**, ra20.
- Bonavida B, Jazirehi A, Vega MI, Huerta-Yepez S, Baritaki S. (2013) Roles Each of Snail, Yin Yang 1 and RKIP in the Regulation of tumor cells chemo-immuno-resistance to Apoptosis. *For Immunopathol Dis Therap* **4**(1).
- Bruce AC, Thomas GR. (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Rev Can* **5**, 65-72.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. (2000) The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol* **2**, 76–83.
- Cassileth PA, Lusk EJ, Torri S, DiNubile N, Gerson SL. (1983) Antiemetic Efficacy of Dexamethasone therapy in patients receiving cancer chemotherapy. *Arch Intern Med* **143**, 1347-1349.
- Chen YX, Wang Y, Fu CC, Diao F, Song LN. (2010) Dexamethasone enhances cell resistance to chemotherapy by increasing adhesion to extracellular matrix in human ovarian cancer cells. *Endocr Relat Cancer* **17**, 39–50.
- Chipuk JE, Green DR. (2009) PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* **17**, 2692-2696.
- Coates JM, Galante JM, Bold RJ. (2010) Cancer therapy beyond Apoptosis: Autophagy and Anoikis as mechanisms of Cell Death. *J Surg Res* **164**, 301–308.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* **23**, 255-275.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. (2003) The BCL-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **53**, 8590-8607.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Rev Mol Cell Biol* **15**, 49-63.
- Davies E, MacKenzie SM. (2003) Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**, 437-445.

- Dengler MA, Weillbacher A, Gutekunst M, Staiger AM, Vöhringer MC, Horn H, Ott G, Aulitzky WE, van der Kuip H. (2014) Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma. *Cell Death and Disease* **5**, e1013.
- Druilhe A, Létuvé S, Pretolani M. (2003) Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: Mechanisms of action. *Apoptosis* **8**, 481-495.
- Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A. (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* **13**, 4131-4138.
- Fesik SA. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Rev Can* **5**, 876-885.
- Fidler IJ. (2002) The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* **70**, 498-505.
- Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. (2011) Mechanism of cell adaptation, When and how do cancer cells develop chemoresistance?. *Cancer J* **17**, 89-95.
- Frei E III, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ, Hananian J, Selawry O, Holland JF, Hoogstraten B, Wolman IJ. (1965) The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood* **26**, 642-656.
- Fulda S, Debatin K-M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WE, et.al. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Nature Cell Death and Differentiation* **19**, 107-120.
- Garraway LA, Jänne PA. (2012) Circumventing Cancer drug resistance in the era of personalized Medicine. *Cancer Discov* **28**, 214-226.
- Gassler N, Zhang C, Wenger T, Schnabel PA, Dienemann H, Debatin K-M, Mattern J, Herr I. (2005) Dexamethasone-induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated ex vivo. *Br J Cancer* **92**, 1084-1088.
- Gaynon PS, Lustig RH. (1995) The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood: molecular, cellular, and clinical considerations. *J Pediatr Hematol Oncol* **17**, 1-12.
- Ge H, Ni S, Wang X, Xu N, Liu Y, Wang X, Wang L, Song D, Song Y, Bai C. (2012) Dexamethasone reduces sensitivity to Cisplatin by blunting p53-dependent cellular senescence in non-small cell Lung Cancer. *Plos One* **7**, Issue 12.
- Gennaro AR. (2003) Remington Farmacia. *Ed Médica Panamericana* **20ª edición**, 1614-1619.
- GLOBOCAN. (2012) International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*.
- Gómez-Lazaro M, Galindo MF, Concannon CG, Segura MF, Fernandez-Gomez FJ, Llecha N, Comella JX, Prehn JHM, Jordan J. (2008) 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem* **104**, 1599-1612.
- González VM, Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. (2001) Is Cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Mol Pharmacol* **59**, 657-663.
- Gottesman MM. (2002) Targeting Apoptosis pathways for new cancer Therapeutics. *Annu Rev Med* **65**, 139-155.

- Greenberg AK, Hu J, Basu S, Hay J, Reibman J, Yie T, Tchou-Wong KM, Rom WN, Lee TC. (2002) Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 320-328.
- Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. (2009) Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* **300**, 7-16.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 647-674.
- Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT. (2000) Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* **257**, 1-12.
- Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, von Knebel-Doerberitz M, Debatin K-M. (2003) Glucocorticoid cotreatment induces Apoptosis resistance toward cancer therapy in Carcinomas. *Cancer Res* **63**, 3112-3120.
- Holohan C, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Rev Can* **13**, 714-726.
- Honma Y, Yamamoto-Yamaguchi Y, Kanatani Y. (1999) Vesnarinone and glucocorticoids cooperatively induce G1 arrest and have an anti-tumour effect on human non-small cell lung carcinoma cells grown in nude mice. *Br J Cancer* **12**, 1807-1817.
- Hou WJ, Guan JH, Dong Q, Han YH, Zhang R. (2013) Dexamethasone inhibits the effect of paclitaxel on human ovarian carcinoma xenografts in nude mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **17**, 2902-2908.
- Hou WJ, Guan JH, Lu H, Dong Q, Han YH, Zhang R. (2014) The effects of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells induced by paclitaxel. *J Ovarian Res* **7**:89.
- Huang DC, Strasser A. (2000) BH3-only proteins — essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839–842.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. (2007) The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**, 1543-1568.
- Iacobuzio-Donahue CA, Velculescu VE, Wolfgang CL, Hruban RH. (2012) Genetic basis of pancreas cancer development and progression. *Clin Cancer Res* **18**, 4257-4265.
- Inaba H, Pui CH. (2010) Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncol* **11**, 1096-1106.
- Jing D, Bhadri VA, Beck D, Thoms JA, Yakob NA, Wong JW, Knezevic K, Pimanda JE, Lock RB. (2015) Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **2**, 273-283.
- Jordan K, Kasper C, Schmoll HJ. (2005) Chemotherapy-induced nausea and vomiting: current and new standards in the antiemetic prophylaxis and treatment. *Eur J Cancer* **41**, 199-205.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554.
- Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L. (2007) Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* **26**, 7445–7456.

- Kamradt MC, Mohideen N, Krueger E, Walter S, Vaughan AT. (2000) Inhibition of radiation-induced apoptosis by dexamethasone in cervical carcinoma cell lines depends upon increased HPV E6/E7. *Br J Cancer* **10**, 1709-1716.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **4**, 239-257.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome C. *Cell Death Differ* **7**, 1166–1173.
- Kroemer G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **16**, 3–11.
- Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. (2009) Snail and Slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* **27**, 2059-2068.
- Lauren L. Campbell M, Kornelia P. (2009) Cancer stem cells: A model in the making. *Curr Opin Genetics Dev* **19**, 44-50
- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Rev Drug Discovery* **7**, 989-1000.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **3**, 183-192.
- Li S, Mawal-Dewan M, Cristofalo VJ, Sell C. (1998) Enhanced proliferation of human fibroblasts, in the presence of dexamethasone, is accompanied by changes in p21Waf1/Cip1/Sdi1 and the insulin-like growth factor type 1 receptor. *J Cell Physiol* **3**, 396-401.
- Lin HY, Muller YA, Hammond GL. (2010) Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol* **316**, 3-12.
- Lowe SW, Lin AW. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-495.
- Lynch JT, Rajendran R, Xenaki G, Berrou I, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. (2010) The role of glucocorticoid receptor phosphorylation in Mcl-1 and NOXA gene expression. *Mol Cancer* **9**:38.
- Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. (2001) The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet* **17**, 178-181.
- Masui K, Gini B, Wykosky J, Zanca C, Mischel PS, Furnari FB, Cavenee WK. (2013) A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. *Carcinogenesis* **4**, 725–738.
- Meikle AW, Tyler FH. (1977) Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *Am J Med* **63**, 200–207.
- Melarangi T, Zhuang J, Lin K, Rockliffe N, Bosanquet AG, Oates M, Slupsky JR, Pettitt AR. (2012) Glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukaemia is associated with a failure of upregulated Bim/Bcl-2 complexes to activate Bax and Bak. *Cell Death and Disease* **3**, e372.
- Mendoza N. (2008) Farmacología Médica. *Ed Médica Panamericana 1ª edición*, 444-448.

- Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. (2001) Dexamethasone inhibits TNF- α -induced apoptosis and IAP proteindownregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol* **133**, 467-476.
- Moran TJ, Gray S, Mikosz CA, Conzen SD. (2000) The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **60**, 867-872.
- Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. (2012) Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Cell* **18**, 348-359.
- Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, Krystal GW, Harada H. (2014) Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death and Disease* **5**, e1052.
- Nieto MA. (2002) The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**, 155-166.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* **45**, 487-498.
- Peiro S, Escriva M, Puig I, Barbera MJ, Dave N, Herranz N, Larriba MJ, Takkunen M, Franci C, Muñoz A, Virtanen I, Baulida J, Garcia A. (2006) Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res* **34**, 2077-84.
- Petrella A, Ercolino SF, Festa M, Gentilella A, Tosco A, Conzen SD, Parente L. (2006) Dexamethasone inhibits TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells via Bcl-xL induction. *Eur J Cancer* **18**, 3287-3293.
- Pflaum J, Schlosser S, Müller M. (2014) p53 family and cellular stress responses in cancer. *Front Oncol* **4**, 304-319.
- Planey SL, Litwack G. (2000) Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2**, 307-312.
- Quail DF, Joyce JA. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Med* **19**, 1423-1437.
- Ramírez CR, Carracedo AJ, Moreno Aguilar FC. (1999). Apoptosis and disease. *Alergol Inmunol Clin* **14**, 367-4.
- Rasheva VI, Domingos PM. (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* **14**, 996-1007.
- Roila F, Ballatori E. (1998) The efficacy and cost-effectiveness of various antiemetic regimens. *Curr Opin Oncol* **10**, 310-315.
- Roos WP, Kaina B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **9**, 440-450.
- Rosenberg B, Vancamp L, Grimley EB, Thompson J. (1965) The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by electrolysis from platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699.
- Rosenberg B, Renshaw E, Vancamp L, Hartwick J, Drobnik J. (1967) Platinum-Induced filamentous growth in Escherichia coli. *J Bacteriol* **93**, 716-721.
- Rowland BD, Peeper DS. (2006) KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nature Rev Can* **6**, 11-23.

- Rutz HP. (2002) Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. *Lancet* **360**, 1969-1970.
- Rutz HP, Herr I. (2004) Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol Ther* **3**, 715-718.
- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. (2012) Apoptosis in cancer – An update. *Asian Pacific J Cancer Prev* **13**, 4873-4878.
- Sasson R, Shinder V, Dantes A, Land A, Amsterdam A. (2003) Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 1047-1056.
- Schaaf MJM, Cidlowski JA. (2003) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**, 37-48.
- Schmidt M, Pauels HG, Lügering N, Lügering A, Domschke W, Kucharzik T. (1999) Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* **6**, 3484-3490.
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. (2004) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation* **11**, S45–S55.
- Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* **1680**, 114-128.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. (2009) The cancer genome. *Nature* **458**, 719-724.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS) (2013) *Secretaría de Salud (SSA)*, México.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports* **7**, 880-885.
- Tabas I, Ron D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biol* **13**, 184-190.
- Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. (2011) Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E11-E24.
- The Merck Manual. (2013) Topics in Principles of Cancer Therapy. *Merck Sharp & Dohme Corp, USA*.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-255.
- Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM. (2005) Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2**, 71-104.
- Umar A, Dunn BK, Greenwald P. (2012) Future directions in cancer prevention. *Nature Rev Can* **12**, 835-848.
- Vincent TL, Gatenby RA. (2008) An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol* **32**, 729-737.
- Wang D, Lippard SJ. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 307-320.

- Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. (2013) The role of Snail in EMT and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 963-972.
- Weinberg RA. (1996) How Cancer Arises. *Sci Am* **275**, 62-71.
- Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T, Conzen SD. (2004) Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* **64**, 1757-1764.
- Wu W-S, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT. (2005) Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing PUMA. *Cell* **123**, 641-653.
- Wu Y, Zhou BP. (2010) Snail: more than EMT. *Cell Adh Migr* **4**, 199-203.
- Yang N, Zhang H, Si-Ma H, Fu Y, Zhao W, Li D, Yang G. (2011) Dexamethasone decreases hepatocellular carcinoma cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis. *Hepato-Gastroenterol* **58**, 1730-1735.
- Yip KW, Reed JC. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**, 6398-6406.
- Yokota J. (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497-503.
- Youle RJ, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev Mol Cell Biol* **9**, 47-59.
- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1931-1936.
- Yu J, Zhang L. (2009) PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27**, S71-S83.
- Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, Liu Z, Rittgen W, Edler L, Buchler P, Debatin KM, Buchler MW, Friess H. (2006) Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol* **29**, 1295-1301.
- Zhang L, Lei W, Wang X, Tang Y, Song J. (2010) Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. *FEBS Letters* **584**, 4646-4654.
- Zhu LF, Hu Y, Yang CC, Xu XH, Ning TY, Wang ZL, Ye JH, Liu LK. (2012) Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest* **92**, 744-52.