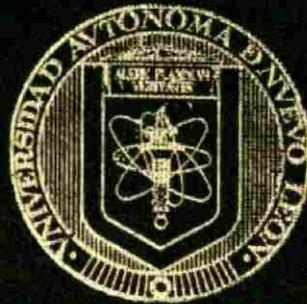


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

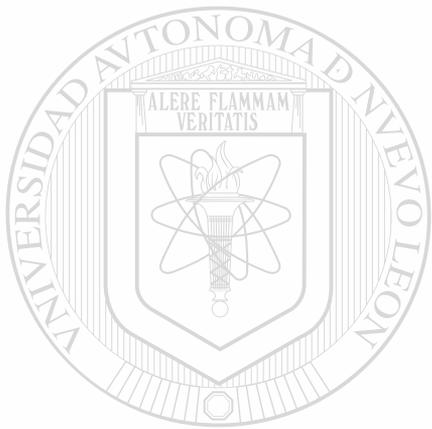


EVALUACION DE LA PRODUCCION DE
APOPTOSIS POR EL COMPUESTO
PEROXISOMICINA A1 (T-514)
IN VITRO

POR
M. en C. FRANCISCO JAVIER MARTINEZ M.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Marzo de 2002



UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

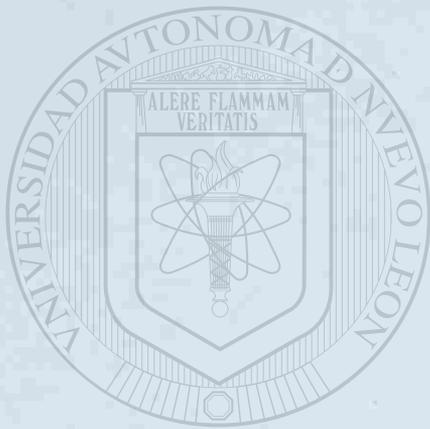
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QH671
.M3
c.1



1080113114



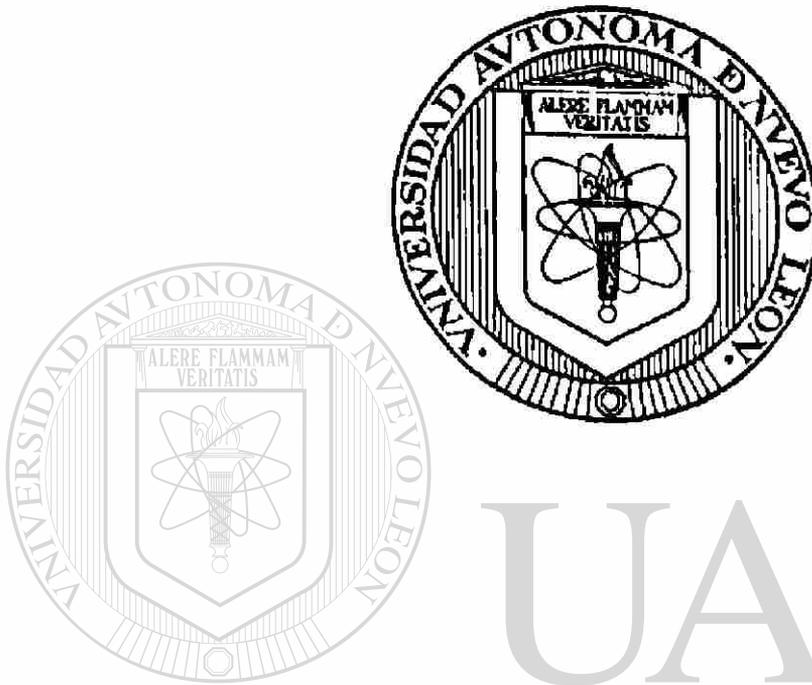
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



UANL

EVALUACION DE LA PRODUCCION DE
APOPTOSIS POR EL COMPUESTO
PEROXISOMICINA A1 (T-514)
IN VITRO.

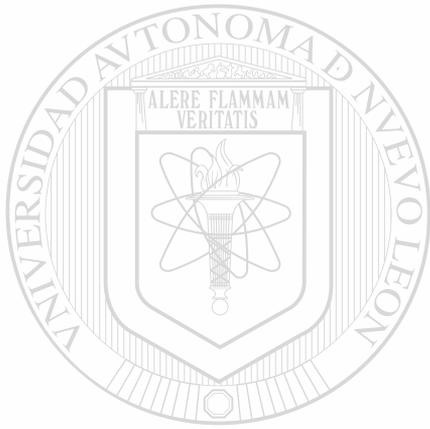
POR

M. en C. FRANCISCO JAVIER MARTINEZ M.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Marzo de 2002.

AH67
.M3
c-1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE APOPTOSIS POR EL COMPUESTO
PEROXISOMICINA A1 (T-514) *IN VITRO***

Aprobación de la Tesis:

DR. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

Director de Tesis

DR. SAMUIL R UMANSKY PhD.

Co-Director de Tesis

DR. med. ALFREDO PINEYRO LOPEZ

Comisión de Tesis

DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ

Comisión de Tesis

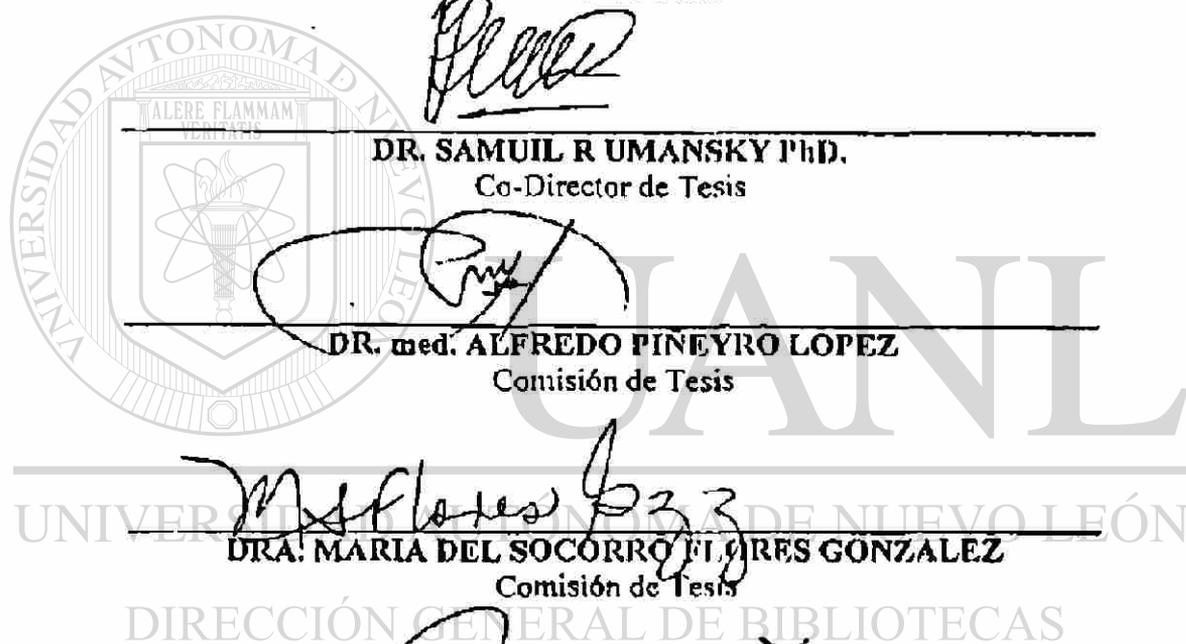
PHD. JORGE VALENZUELA RENDON

Comisión de Tesis

DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA

Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado



**EVALUACION DE LA PRODUCCION DE APOPTOSIS POR EL
COMPUESTO**

PEROXISOMICINA A1 (T-514) *IN VITRO*.

Presentado por

M en C. Francisco Javier Martínez Martínez



Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas y la co-Dirección del Dr., Ph. D y D. en C. Samuil R. Umansky.

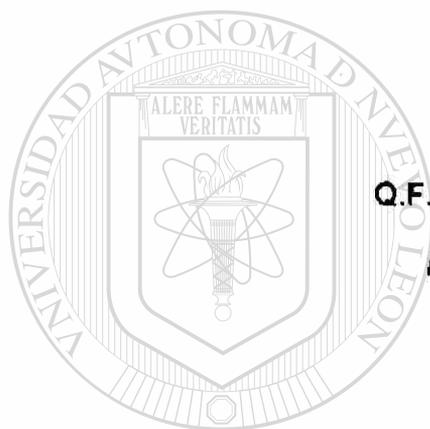
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Director de Tesis**

DEDICATORIA



A la memoria de mi madre:

Q.F.B. y Lic. en Enfermería y Obstetricia,

María Soledad Martínez Valadez.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Jesús Ancer Rodríguez**, Director de la facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Por *su apoyo* para realizar mi estancia en la compañía LXR Biotechnology Inc.,(laboratorio de Farmacología Molecular) en la ciudad de Richmond CA. en los Estados Unidos y en el Centro Nacional Francés para Investigación del Cáncer: INSERM U-524 (Laboratorio de Farmacología Antitumoral), en la ciudad de Lille, Cedex, en Francia. Por la compra de reactivos para procesar cultivos celulares. Por *su interés y seguimiento* de la investigación. Por su *valiosa amistad profesional* y por su impulso para la realización de mi trabajo, muchas gracias.

Al Dr. **Alfredo Piñeyro López**, Jefe del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., por incorporarme en su grupo de trabajo de investigación en toxicidad de los productos naturales obtenidos de las plantas del género *Karwinskia*. Ante todo, por su amistad y por *su confianza* incondicional e inmerecida que depositó en mi persona en todo momento, por aceptarme en su Departamento para llevar a buen término el presente trabajo. Por su *aval* para los intercambios científicos que realicé. Gracias por su orientación y revisión en su calidad de miembro de la comisión de la tesis, por su interés en todo momento. Me es grato confirmar aquí, su prestancia, su gran calidad humana y como investigador científico.

A la Dra. **Lourdes Garza Ocañas**, Maestra e Investigadora del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., quien con su trato delicado y profesional tuvo a bien *asesorar* con mucho acierto y paciencia la realización del presente trabajo. Por todas sus orientaciones para el manejo experto de cultivos celulares y en la aplicación juiciosa de los criterios, para valorar los resultados. Gracias igualmente por su fina amistad.

Al Dr **Samuil R. Umansky**, Jefe de Investigación Científica y del Laboratorio de Farmacología Tumoral en la Cía. LXR Biotechnology Inc., en Richmond CA. Por la supervisión en su laboratorio, en los métodos para identificar los mecanismos moleculares y celulares de Apoptosis. Por sus amables comentarios a mi trabajo y revisión del manuscrito que fue publicado en *Drug and Chemical Toxicology* . Por su *interés* en mi trabajo y como Co-Asesor. Reconozco su calidad humana y científica. Agradezco su amistad y disponibilidad.

A la Dra. María del Socorro Flores González, Maestra e Investigadora del Departamento de Microbiología y del Centro de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., por su interés continuo en mi trabajo, por sus observaciones *acuciosas* y sus correcciones que fueron importantes en la orientación del presente trabajo. Agradezco su fina amistad.

Al Dr. Jorge Valenzuela Rendón, Maestro e Investigador de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por sus *amables* comentarios a mi trabajo. Por su amistad profesional, por la revisión y su apoyo en su calidad de miembro de la comisión de tesis doctoral.

Al Dr. L. David Tomel, Director General (C.E.O.) de LXR Biotechnology Inc., en la ciudad de Richmond CA, quien *auspició* el intercambio científico entre su compañía y la Facultad de Medicina a través del Departamento de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L. Reconozco su capacidad directiva y en el desarrollo de la organización, a la vez, su gran calidad humana y como investigador científico. Por su sincera amistad y por su apoyo con decisión, muchas gracias.

Al Dr. Christian Bailly, Director del Laboratorio de Farmacología Antitumoral, Unidad 524 del Centro de Investigación Francés para el Cáncer, (INSERM) de la ciudad de Lille, Francia; quien *auspició* mi estancia de investigación en su laboratorio. Por la *autorización* y supervisión para realizar ensayos moleculares y estudiar las vías de transducción de la Apoptosis por acción del compuesto PA1. Por acudir a la visita de intercambio académico que realizó, en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y presentar el seminario "el desarrollo de nuevos fármacos anticancerosos." Por participar en el Simposium de Genética y Fármacos, en el Congreso de 'Biomedicina Molecular 2000' en la Cd. de Monterrey, N.L.. Por su paciencia en la redacción conjunta y en la revisión del manuscrito publicado en *Chemical Research in Toxicology*. Por motivar a su personal de investigación en su laboratorio para colaborar en el presente trabajo. Por su amistad, muchas gracias.

Al personal científico y administrativo de la Cía. LXR Biotechnology Inc. en la ciudad de Richmond CA.: Al Dr. Donald H. Picker, Presidente de la compañía por *autorizar* el intercambio científico con la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Por sus atenciones inmerecidas, durante mi estancia. Al Dr. Guo Qing Zeng, quien me *orientó* en los ensayos de cultivos de monocapas, citometría de flujo, cuentas celulares y en las

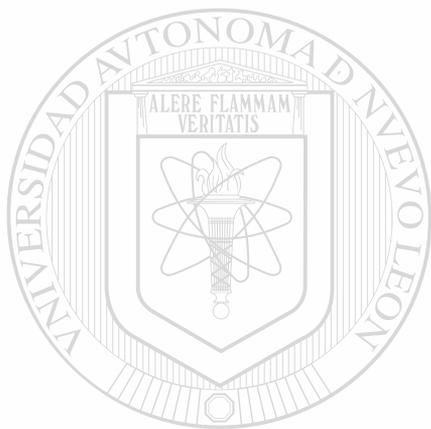
técnicas de microscopía con fluorocromos. Reconozco su trabajo y calidad científica ejemplares. Al Dr. **Michael C. Kiefer** Jefe del laboratorio de Biología Celular en la compañía; agradezco sus *amables* comentarios y la revisión del manuscrito original y del resumen de mi trabajo que presenté en el Congreso Anual No.90 de la AACR, en Filadelfia, Pennsylvania. Al Dr. **Phillip Pemberton**, Jefe de la Sección de Ensayos Clínicos de la compañía, por su orientación y por la revisión crítica del manuscrito original publicado en *Drug Chem Toxicol*. Al Dr. **Eugene Shektman** Investigador científico de la compañía, por su *orientación* en la recopilación de datos científicos e informática. Por su amistad y dedicación, muchas gracias. A **Angela Cannas y Cindy Thelman**, por su *auxilio* técnico-logístico para la realización de los cultivos celulares. A **Linda Michaels y Leah Wong** por su *auxilio* secretarial.

Al personal científico y administrativo del laboratorio de Farmacología Antitumoral del Centro Francés para la Investigación del Cáncer (INSERM U-524), en Lille, Francia. A los investigadores **Amélie Lansiaux, William Laine, Christine Mahieu y Nicole Watzet** por *orientación* y en la *realización* de los ensayos de biología celular y molecular y citometría de flujo en líneas celulares HL60 HL60/MX2 de leucemia humana. Al Dr **Hervé Vezin** del Laboratorio de Química Orgánica y Física Aplicada de la Universidad de Lille (CNRS), Francia por la *realización* de los estudios adicionales (ESR y MS) fuera del protocolo, en el compuesto T-514 y en el radical T-510R.

Al personal profesional y administrativo del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., Monterrey N.L, **sin excepción de alguno(a)**, por *aceptarme* en su grupo de trabajo y por su trato amable. Al Dr. **Oscar Torres Alanís**, por su amistad profesional; **Dra Noemí Waksman; Dra. M. Victoria Bermúdez Barba, Q.C.B. Martha Salazar**, por su *colaboración* y amistad profesional y disponibilidad durante los estudios que realizamos en conjunto. A la **Dra. Rosalba Ramírez Durón**, por proporcionar el compuesto PA1 purificado. Por su interés y *colaboración* constante. Aprecio su dedicación, su amistad y su calidad profesional y humana.

A la Sra. **Blanca González** por sus *finas atenciones*, inmerecidas para un servidor. Gracias a su interés y apoyo constante, el desarrollo de mi trabajo dentro y fuera del Departamento se hizo más fácil con su ayuda. Aprecio su calidad humana y su talento en el trabajo.

Al Dr. José Russo y Dra. Irma H. Russo Investigadores y Decanos Científicos en el Fox Chase Cancer Center y Profesores de la Universidad Thomas Jefferson en Filadelfia Pennsylvania, USA, por su gran calidad humana y dedicación ejemplar al trabajo científico, lo cual es un modelo a seguir. Por su *interés* en mi trabajo, sus comentarios y *sugerencias* alentadores y congruentes. Por *avaluar* la presentación de los resultados preliminares, durante el Congreso No. 90 de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer, (AACR). Ante todo, por su valiosa, estimulante y perdurable amistad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Francisco Javier Martínez M.

Fecha de Graduación:
Marzo de 2002.

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: **EVALUACION DE LA PRODUCCION DE APOPTOSIS POR EL COMPUESTO PEROXISOMICINA A1(T-514) IN VITRO.**

Número de páginas: Candidato para la obtención del grado de DOCTOR en Medicina.

Area de Estudio: Apoptosis-Carcinogénesis.

Propósito y Método del Estudio. La peroxisomicina A1 (PA1), extraída de la planta *K. humboldtiana*, es una antracenona dimérica. Se ha demostrado toxicidad selectiva a la PA1 en líneas tumorales. La Apoptosis, es una forma de muerte celular, regulada genéticamente por mecanismos bioquímicos celulares con vías de Intervención farmacológica. La sensibilidad tumoral a los agentes quimioterápicos, se efectúa a través de la Apoptosis. En el presente estudio, se describe la acción celular específica del compuesto PA1 "in vitro", por apoptosis. Se investigaron los efectos de la PA1 en el ciclo celular (CC) y el desarrollo de apoptosis, en diez líneas celulares mediante citometría de flujo (CF) y detección con fluorocromos. Se investigó además la vía de transducción de la apoptosis y los sitios acción de la PA1 con técnicas de biología celular y molecular (electroforesis en gel de agarosa; Western Blot; espectrofotometría e inmunquímica, para degradación enzimática) en células derivadas de leucemia humana.

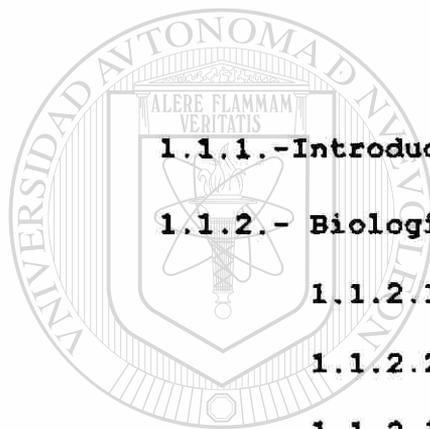
Conclusiones y contribuciones. El presente estudio establece la acción del compuesto PA1 en células normales y tumorales por medio de apoptosis y la vía de transducción de éste fenómeno biológico en células neoplásicas de origen humano. Se sugiere que la PA1 pudiera tener acción quimioterapéutica para el cáncer por este mecanismo. Se estableció que la PA1 produce degradación del DNA y detención del CC en la fase G2 confirmándose el desarrollo de apoptosis por este compuesto. En las células derivadas de leucemia humana, tratadas con PA1, se demostró que la Topoisomerasa II, la polimerasa de la poli-ADP ribosa (PARP) y las enzimas ejecutoras de la apoptosis, caspasas 3 y 8, son blancos de este compuesto para la inducción de apoptosis.

FIRMA DEL ASESOR


Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
1.1.- APOPTOSIS	
1.1.1.- Introducción.	2
1.1.2.- Biología de la Apoptosis.	3
1.1.2.1.- Morfología de la apoptosis.	5
1.1.2.2.- Bioquímica de la apoptosis.	8
1.1.2.3.- Genética y regulación de la apoptosis.	12
1.1.3.- Mecanismos de la Apoptosis.	14
1.2.- CANCER	
1.2-1.- El concepto y origen del cáncer.	16
1.2.2.- El proceso de estadios múltiples en el cáncer.	18
1.2.4.- La Apoptosis y el Cáncer.	19
1.2.5.- La Apoptosis en la Patogenia del Cáncer	20



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1.3.- LA APOPTOSIS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CANCER

1.3.1.- Las células susceptibles mueren por apoptosis.	22
1.3.2.- Los mecanismos de la apoptosis inducida por quimioterapia.	24

1.4.- PEROXISOMICINA A₁

1.4.1.- Antecedentes e historia científica del estudio.	26
1.4.2.- Importancia y originalidad del estudio.	29
1.4.3.- Hipótesis.	31
1.4.4.- Objetivo general.	31
1.4.5.- Objetivos específicos.	31

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1.- Preparación del compuesto Peroxisomicina A ₁	32
2.2.- Líneas celulares y condiciones de cultivo.	32
2.3.- Exposición de las células a PA ₁ y ensayo de citotoxicidad.	32
2.4.- Ensayo para apoptosis.	35
2.5.- Análisis del ciclo celular.	35

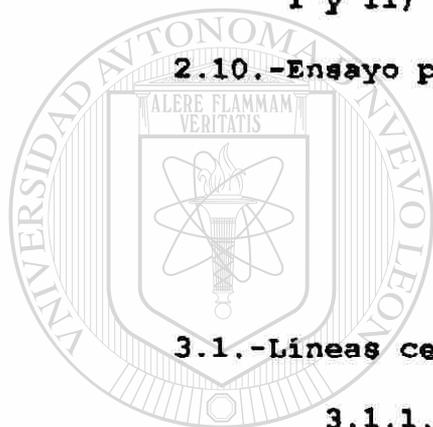
Estudio de la transducción de la vía apoptótica en células HL-60 y HL-60/MX2 de leucemia humana.

2.6.- Cultivo de células y ensayo de viabilidad celular	36
2.7.- Análisis del ciclo celular.	36
2.8.- Ensayo de degradación de PARP.	37
2.9.- Ensayo de relajación de DNA (Topoisomerasas I y II)	38
2.10.- Ensayo para degradación de caspasas 3 y 8.	39

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1.- Líneas celulares normales y tumorales.	
3.1.1.- Evaluación de citotoxicidad.	40
3.1.2.- Ensayo para apoptosis.	40
3.1.3.- Análisis del ciclo celular.	46
3.1.4.- Apoptosis independiente de caspasas.	49
3.2.- Transducción de la vía apoptótica.	
3.2.1.- Citotoxicidad en células HL-60 y HL-60/MX2.	49
3.2.2.- Alteraciones en el ciclo celular.	53
3.2.3.- Degradación de PARP.	53
3.2.4.- Inhibición de la enzima DNA Topoisomerasa II.	56
3.2.5.- Activación de caspasas 3 y 8	56



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

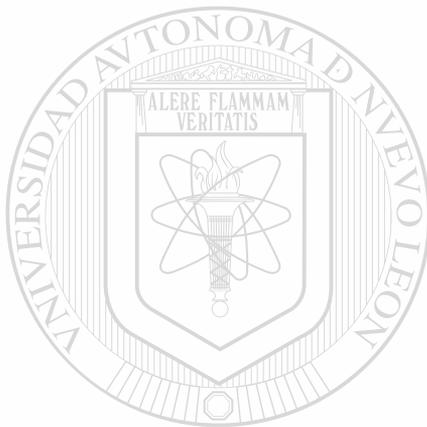
CAPITULO 4

DISCUSION 60

CAPITULO 5

CONCLUSIONES 68

Referencias 69



UANL

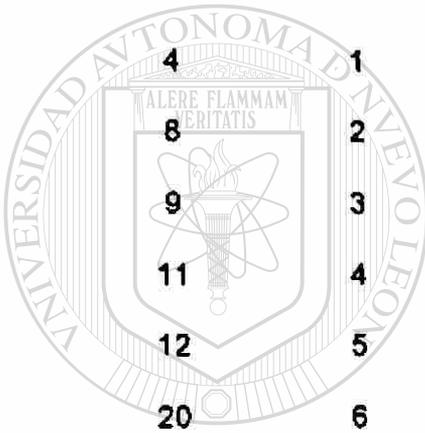
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lista de Tablas.

Página	Tabla No.	Contenido
4	1	Estímulos internos y externos para apoptosis.
8	2	Diferencias entre necrosis y apoptosis.
9	3	Secuencia de eventos durante la apoptosis.
11	4	Eventos bioquímicos durante la apoptosis.
12	5	Clasificación de las caspasas.
20	6	Lista de los oncogenes.
<hr/>		
27	7	Agentes asociados con apoptosis.
38	8	Lineas celulares.
48	9	Muerte celular por apoptosis en líneas celulares.
57	10	Citotoxicidad en células HL-60 y HL-60/MX2, con la PA1.



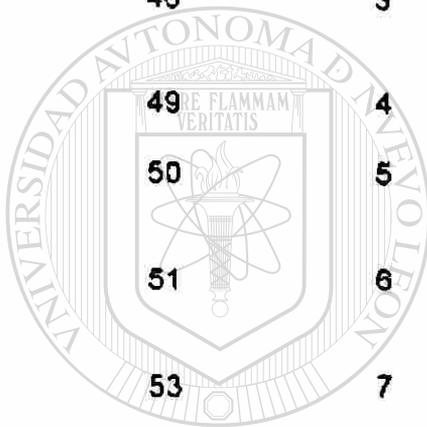
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Lista de Figuras.

Página	Figura No.	Contenido
7	1	Alteraciones morfológicas en la apoptosis.
31	2	Estructura química de la peroxisomicina A1.
46	3	Sensibilidad diferencial de células normales y tumorales a la PA1.
49	4	Células teñidas con fluorocromo.
50	5	Inducción de apoptosis dependiente de la dosis de PA1.
51	6	Inducción de degradación del DNA con PA1.
53	7	Detención del ciclo celular con PA1.
55	8	Prevención de apoptosis con z-VAD.
56	9	Prevención inadecuada de necrosis: z-VAD.
59	10	Cambios en el ciclo celular con PA1 en células HL-60.
59	11	Cambios en el ciclo celular con PA1 en células HL-60/MX2.
60	12	Degradación de PARP por PA1.
62	13	Efecto de PA1 sobre Topoisomerasa I.
62	14	Efecto de PA1 sobre Topoisomerasa II.
64	15	Degradación de sustrato de caspasa 3.
64	16	Degradación de sustrato de caspasa 8.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
5FU	5-Fluorouracilo
5FD	Desoxinucleósido de monofosfato (de 5FU)
Ara-C	Arabinósido C
ATP	Trifosfato de adenosina
BCNU	Carmustina
Ca ⁺⁺	Calcio iónico
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
Da	Daltones
DL ₅₀	Dosis letal al 50%
DNA	Acido desoxiribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Difosfato
EDTA	Etildiaminotetracético
FBS	Suero Fetal Bovino
FI-3	Lectura de la emisión fluorescente #3
H	Hora
IgG	Inmunoglobulina G
KCl	Cloruro de potasio
KD	Kilodaltones
m-AMSA	Amsacrina

MEM	Medio esencial mínimo
Mg⁺⁺	Magnesio iónico
MgCl₂	Cloruro de magnesio
Min	minuto
µg	microgramo
ml	mililitro
µM	micomolar
mM	milimolar
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
MTS	Metilsulfoxido
NADPH	Nicotina, adenina dinucleótido fosforilada, reducida
nm	nanómetro
PA1	Peroxisomicina A1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RNA	Acido ribonucleico
RNAse	Ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris-HCl	Amortiguados base de ácido clorhídrico
U.I.	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta/visible
vs.	versus

Capítulo 1

INTRODUCCION

La interacción de un agente terapéutico determinado con su sitio 'blanco', altera funciones celulares esenciales y en última instancia lleva a la muerte celular¹. En particular los esfuerzos por entender la respuesta terapéutica a los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer, se han orientado al conocimiento de cómo los agentes quimioterapéuticos muestran capacidad para alcanzar sus sitios de acción intracelular y para entender la naturaleza molecular de la interacción entre el fármaco y su blanco.^{2,3}

Los modelos *in vitro* de cultivos celulares constituyen sistemas simples para estudiar la citotoxicidad hacia células de origen tumoral y el fenómeno de la muerte celular causada por la quimioterapia.⁴

La citotoxicidad de muchos agentes anticancerosos puede estar determinada, en gran parte, por eventos subsecuentes a la interacción entre el fármaco y el sitio blanco. Las diferentes formas de daño celular o la alteración metabólica, pueden producir señales en el interior de las células que convergen en un programa genético común de muerte celular. Estudios recientes, indican que muchos de los agentes anticancerosos actúan a través del fenómeno de muerte celular programada o Apoptosis.⁵⁻⁷

1.1.- APOPTOSIS

1.1.1. Introducción

El término Apoptosis, acuñado por Kerr,⁹ se aplicó al cambio morfológico de muerte celular por un proceso diferente a la necrosis. Las células mueren por la acción de un programa genético, en condiciones fisiológicas, por daño o cuando son senescentes, para preservar así al organismo entero.⁹

Hipócrates de Cos utilizó originalmente este concepto, para referir la dislocación de los huesos¹⁰ y posteriormente Galeno, señaló así la caída de las escaras,¹¹ la curación de las heridas y la lesión inflamatoria.¹² En el siglo XIX Carl Vogt¹³ realizó el primer reporte acerca de la muerte celular 'natural' durante el desarrollo, su estudio se publicó poco después del establecimiento de la Teoría Celular por Schleiden y Schwann entre 1839 y 1842.

La apoptosis es un fenómeno relevante que incluye la diferenciación de eucariotes, el desarrollo de organismos, la maduración tisular y las funciones del sistema inmune,¹⁴⁻¹⁷ además del daño celular inducido por agentes físicos y químicos.¹⁸⁻²¹ La participación de la apoptosis se ha demostrado para la carcinogénesis, la homeostasis tumoral y el mecanismo de acción de los agentes quimioterápicos,²²⁻²⁴ también se presenta en la patogénesis de enfermedades autoinmunes e infecciones virales.²⁵

El término apoptosis, de las raíces griegas apos y ptosis, que significan 'caída de' o 'caer en partes'.²⁶ La apoptosis es un proceso complejo, activo y estrictamente regulado en el que las células se autodestruyen, sin lesión a células contiguas²⁷⁻³⁰. La duración del proceso depende del estímulo que lo induce y del tipo celular y se estima que varía de 12 a 24 h.³¹ Los cambios visibles en la morfología celular tienen una duración de 2 a 3 h.³²

La apoptosis es regulada por oncogenes y genes que suprimen tumores. Estos, son altamente conservados durante la evolución biológica.^{33,34} Los genes p53, cMyc, Rb y cFos,³⁵ juegan un papel importante en el ciclo celular, lo cual indica que la proliferación celular y la apoptosis son procesos acoplados. Los genes actúan para potenciar y reprimir funciones y regular la apoptosis.³⁶⁻³⁸ La apoptosis es esencial en los organismos multicelulares, tiene un rango amplio de implicaciones en la biología humana.^{39,40}

1.1.2.- Biología de la Apoptosis.

En todos los tejidos normales existe un balance entre la proliferación celular y la muerte celular.⁴¹ La fisiología de la muerte celular por apoptosis, ha sido investigada en años recientes.⁴² Los genes del crecimiento celular participan en la apoptosis e incluyen c-myc y p53, los genes bcl-2 y bax. La familia de proteasas de cisteína o caspasas es la parte ejecutora de la bioquímica del proceso de degradación celular.⁴³

La apoptosis se inicia selectivamente por estímulos externos o internos que activan cambios morfológicos y bioquímicos bien definidos en las células.⁴⁴ Puede existir la pérdida de una señal que impide la apoptosis⁴⁵ (Tabla 1). Las células en apoptosis, pueden observarse al microscopio con cierta facilidad y adiestramiento; los hallazgos moleculares característicos como la fragmentación internucleosomal del DNA y el uso de técnicas de histoquímica como el marcaje con digoxigenina, el método de marcaje terminal *in situ* y la citometría de flujo, facilitan con mayor certeza su reconocimiento.

Los cambios celulares (morfológicos y moleculares) de apoptosis, han sido descritos recientemente, su regulación y el papel que desempeña este mecanismo biológico, en el desarrollo normal de los tejidos y en los procesos patológicos.⁴⁶⁻⁴⁹

TABLA 1

ESTIMULOS EXTRACELULARES E INTRACELULARES PARA LA PRODUCCION DE APOPTOSIS.

ESTIMULOS EXTERNOS:

Linfotoxinas: Factor de Necrosis Tumoral ($TNF\alpha$)
Factor de Crecimiento Tumoral ($TGF\beta$).

Glucocorticoides.

Adenosina.

Valinomicina.

Activación mediada por receptores:
para linfocitos T y timocitos.

Radiación ionizante.

Supresión de citocinas.

ESTIMULOS INTERNOS:

Genes de respuesta primaria a la diferenciación mieloide (MyD).

Genes que detienen el crecimiento y genes de reparación del daño al DNA.

Genes específicos para detención del crecimiento celular (gas).

Genes supresores de tumores y oncogenes: p53, bcl 2, cmyc, fos, ras.

1.1.2.1.- Morfología de la apoptosis

La apoptosis afecta a células individuales aisladas, en lugar de grupos de células o de un tejido u órgano como lo hace la necrosis. Las alteraciones morfológicas en la apoptosis se muestran en la Figura 1. Las diferencias entre la apoptosis y la necrosis se describen en la Tabla # 2. Una vez instalado el proceso, éste se desarrolla rápidamente. El aspecto celular característico es la reducción del tamaño de la célula o 'arrugamiento' celular. La cromatina nuclear, al compactarse, se dispone en masas densas localizadas hacia la membrana nuclear con picnosis. El núcleo se desintegra en fragmentos (cariorrhexis). La célula desarrolla procesos citoplásmicos, que contienen fragmentos nucleares condensados. Estos fragmentos, al separarse de las células en apoptosis, forman cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados.⁵⁰ Las células enteras pueden condensarse también en un solo cuerpo apoptótico.

Al microscopio electrónico, los cambios más tempranos que se observan son: la pérdida de las uniones intercelulares y de otras especializaciones de la membrana como las microvellosidades. Más tarde, las mitocondrias se alteran y presentan edema. El retículo endoplásmico, se dilata y forma vesículas que se fusionan con las membranas plasmáticas. El citoplasma se reduce, y se presentan circunvoluciones al perder contacto con células adyacentes. A continuación, la célula entera se rompe en múltiples fragmentos que se encuentran limitados por la membrana citoplásmica, éstos son de tamaño variable (cuerpos apoptóticos), en su interior se encuentran organelos celulares intactos. Una vez que la célula ha sido degradada, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos adyacentes o por células epiteliales, el endotelio vascular o las células tumorales. La fagocitosis, no induce la liberación de enzimas proteolíticas o la generación de metabolitos radicales de oxígeno. Así, la remoción de los cuerpos apoptóticos no causa respuesta inflamatoria. Esta forma de realizar la fagocitosis es un hecho crucial de la apoptosis pues permite remover las células sin producir daño a las células contiguas. La apoptosis, puede 'escapar' a la observación y pasar inadvertida por la brevedad de su duración. Se han desarrollado marcadores

Células Parenquimatosas

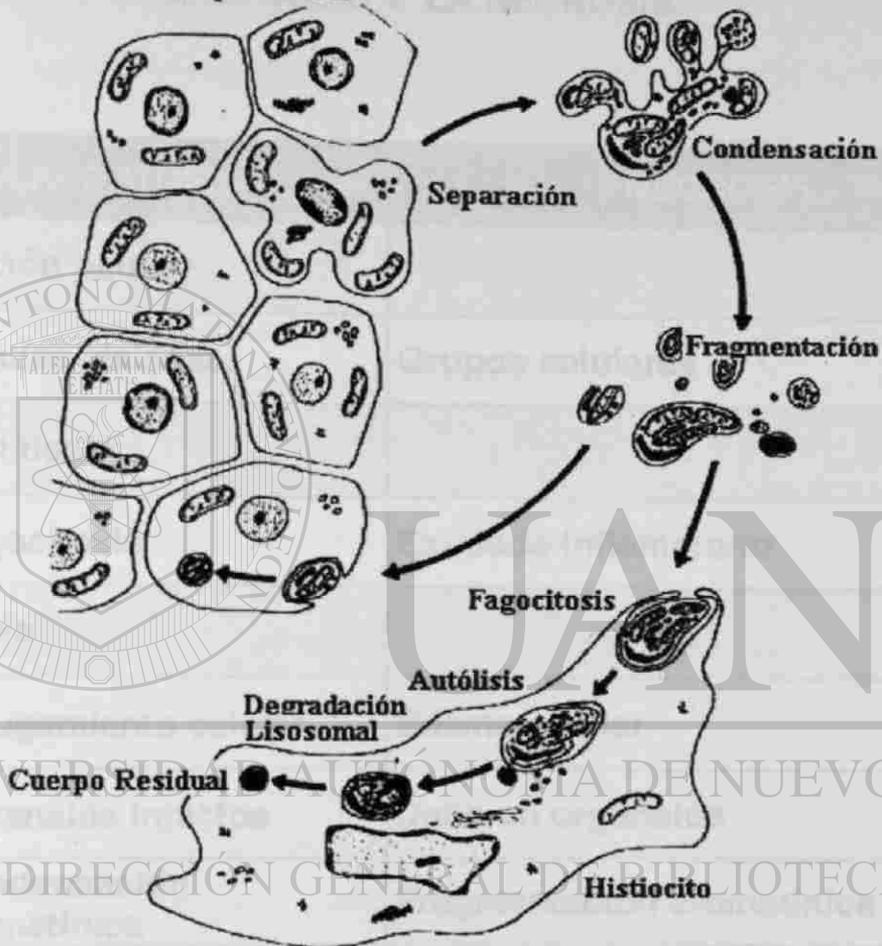


Figura 1. Alteraciones morfológicas en la apoptosis

TABLA 2

DIFERENCIAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS ENTRE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS.

APOPTOSIS	NECROSIS
Distribución tisular:	
<ul style="list-style-type: none"> • Células aisladas 	Grupos celulares
Reacción tisular:	
<ul style="list-style-type: none"> • Fagocitosis 	Exudado inflamatorio
Morfología:	
<ul style="list-style-type: none"> • Arrugamiento celular 	Edema celular
<ul style="list-style-type: none"> • Organelos intactos 	Daño en organelos
<ul style="list-style-type: none"> • Condensación cromatínica 	Fragmentación cromatínica
<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpos apoptóticos 	Degradación citoplásmica
<ul style="list-style-type: none"> • Membrana celular intacta 	Daño en la membrana
Bioquímica:	
<ul style="list-style-type: none"> • Activación de endonucleasa 	Daño en la bomba de iones
<ul style="list-style-type: none"> • Ruptura nucleosomal de DNA 	Activación de lisosomas

específicos para identificar el proceso, entre estos se encuentra, la degradación del DNA nuclear en fragmentos regulares o múltiplos de 200 pares de bases o el 'marcaje' del DNA *in situ* y otros. La Tabla 3 muestra la secuencia de eventos que ocurren durante el proceso de apoptosis.

1.1.2.2.- Bioquímica de la Apoptosis.

Entre los eventos que caracterizan al proceso de apoptosis, se encuentra la fragmentación del DNA. Las endonucleasas dependientes de Ca^{++} y de Mg^{++} se activan y causan fragmentación del DNA en múltiplos de 180 a 200 pares de bases. Así se origina la separación del DNA en el patrón de 'escalera', de la electroforesis en gel de agarosa, un marcador importante de la apoptosis.⁵¹ La transglutaminasa que entrecruza proteínas del citoplasma, igualmente se halla involucrada en la alteración de las propiedades citoadhesivas de las células en apoptosis. La apoptosis requiere de la producción activa de energía (ATP).

Los glicanos inmaduros, normalmente adosados a glucoproteínas maduras, se exponen al exterior de la membrana de las células para que sean fagocitadas. Las moléculas de adhesión celular, como la vitronectina y los receptores de trombospondina, participan en el reconocimiento y en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. Otro componente bioquímico expuesto en la superficie celular al inicio del proceso es la fosfatidilserina. Las proteasas como la calpaína degradan el citoesqueleto en la apoptosis.⁵² Las proteasas de cisteína (caspasas) juegan un papel central como 'ejecutoras' del proceso⁵³⁻⁵⁵ Se han identificado más de una docena de caspasas en los humanos y cerca de dos terceras partes de estas funcionan durante la apoptosis. En la Tabla 4 se muestran los eventos bioquímicos que se presentan durante la apoptosis. En la Tabla 5, se muestra la clasificación y participación de las caspasas durante la apoptosis.

TABLA 3

SECUENCIA DE EVENTOS DURANTE LA APOPTOSIS.

- **SEPARACION CELULAR.** Ruptura de complejos de unión y microvellosidades.
- **CONTORNO LISO DE LA SUPERFICIE CELULAR.**
- **PRESENTACION DE GLUCOPROTEINAS DE SUPERFICIE.**
- **DETERIORO DE LA INTEGRIDAD DEL CITOESQUELETO.**
- **CONDENSACION DEL CITOPLASMA Y COMPACTACION DE LOS ORGANELOS.**
- **REDUCCION DEL TAMAÑO NUCLEAR Y CONDENSACION DE LA CROMATINA.**
- **FRAGMENTACION DEL DNA.**
- **FORMACION DE BURBUJAS CITOPLASMICAS.**
- **LIBERACION DE CUERPOS APOPTOTICOS.** Circunscritos por membrana celular intacta.
- **FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTOTICOS.** Por células adyacentes y degradación subsecuente.

TABLA 4

EVENTOS BIOQUIMICOS DURANTE LA APOPTOSIS.

<u>Molécula</u>	<u>Función</u>
c-myc	Proliferación del ciclo celular en la fase G1.
p53	Detención en G1 del ciclo celular por daño al DNA
Rb	Control del ciclo celular en G₀/G1.
	Interacción con p53 y modulación por fosforilación.
bcl-2	Protege las células al impedir la apoptosis.
bcl-x	Produce transcritos en forma alterna.
bax	Dimeriza con bcl-2 y antagoniza su función.
ICE/CED-3	Familia de genes de proteasas de cisteína; 'ejecutan' la apoptosis.
<hr/>	
Calcio Iónico	Activación de enzimas para la Apoptosis.
Transglutaminasa	Estabilización de cuerpos apoptóticos.
Endonucleasa	Dependiente de Ca^{**} y Mg^{**}. Responsable de la degradación del DNA.
Vitronectina y Trombospondina	Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.
Granzima B	Proteasa involucrada en apoptosis inmune
Calpaína	Proteasa que degrada el citoesqueleto.
Fosfatidilserina y Glucoproteínas	Moléculas de reconocimiento en la membrana citoplásmica.
Ceramida	Lípido mediador de apoptosis.

TABLA 5

**CLASIFICACION Y PARTICIPACION DE LAS CASPASAS
(PROTEASAS DE CISTEINA) EN LA APOPTOSIS.**

Proteasa	Nombre alternativo	Inhibidores
Caspasa 1	ICE/CD3	YVAD, DEVD, IAP, p35, crmA
Caspasa 4	ICErel-II, TX, ICH-2	YVAD, DEVD
Caspasa 5	ICErel-III TY	
Caspasa 2	ICH-1 Nedd-2	IAP, p35
Caspasa 9	ICE-LAP6	
Caspasa 3	CPP32, Yama, apopainina	DEVD (crmA)
Caspasa 6	Mch2	VEID
Caspasa 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH1	DEVD, p35
Caspasa 8	FLICE, MACH, Mch5	crmA
Caspasa 9	ICE, LAP6, Mch6	
Caspasa 10	Mch4, FLICE2	DEVD

1.1.2.3.- Genética y regulación de la apoptosis.

Los oncogenes y los genes que suprimen tumores participan y regulan la respuesta de la célula a través de las moléculas que inician el proceso de apoptosis, las proteínas que realizan la transducción del mensaje y las proteínas ejecutoras. Un total de 14 genes controlan el proceso en eucariotes inferiores y las mutaciones en estos genes causan efectos específicos en la vía de transducción de la muerte celular ⁵⁶. Los genes *ced-3* y *ced-4* (*ced* = *cell death*), inducen la apoptosis; el gen, *ced-9*, la inhibe en las células que se hallan destinadas a vivir. El gen *ced-3* codifica para una proteína similar a dos proteínas de los mamíferos denominadas ICE o enzimas convertidoras de la interleucina 1 (interleukin-1 β converting enzyme o ICE). Las proteasas ICE, participan activamente en la producción de apoptosis, en las células de los mamíferos. ⁵⁷

En los mamíferos, tres moléculas equivalentes a la proteínas CED-4, inicialmente denominadas Apafs (apoptosis protease-activating factors), son factores activadores de proteasas en la apoptosis. Apaf-1 es similar a CED-4 y Apaf-2 corresponde al citocromo c ⁵⁸. La unión de la proteasa de muerte celular CED-4 a la CED-3, promueve la apoptosis. Apaf-1 puede igualmente iniciar la apoptosis en células de mamíferos al activar las proteasas de cisteína tal como la caspasa-3 ⁵⁹ La proteína Ced-9 es similar al producto de *bcl-2*, un oncogen en las células de mamíferos, ambos pertenecen a la misma familia ⁶⁰ Las células infectadas por virus, inician señales 'para dar aviso' a células vecinas y al sistema inmune. Muchos virus inhiben esta señal en las células infectadas, la cual es esencial para la eliminación de la célula por apoptosis. ⁶¹

Los oncogenes, estimulan el crecimiento de las células y contribuyen a la formación de tumores. Los genes supresores de tumores, inhiben el crecimiento celular, a través de efectos específicos, en las proteínas que participan en el ciclo celular. A la vez, se hallan involucrados en la apoptosis. Gran cantidad de oncogenes, participan en el control de la apoptosis en los mamíferos.

La familia de genes BclX, participa en la apoptosis. La capacidad de Bcl-2 para proteger a las células de estímulos dañinos y las vías de transducción que utiliza, establecen la regulación de la apoptosis por Bcl-2.⁶² El gen *bcl-2* (linfoma de células B tipo 2), se halla en el cromosoma humano No. 18. Este es un sitio de translocación recíproca en las células B del linfoma folicular.⁶³ Este gen, codifica para una proteína de la membrana celular, Bcl-2, presente en el retículo endoplásmico, en la membrana nuclear y en las membranas externas de las mitocondrias.⁶⁴⁻⁶⁶

La expresión de los miembros de la familia Bcl-2 en células eucariotes y el balance entre pro-apoptosis y anti-apoptosis, es variable como resultado de las reacciones de homo- y de heterodimerización de esta proteína. Otras proteínas se unen a Bcl-2 y como resultado, se suprime la apoptosis con mayor eficiencia, en particular, cuando es inducida por los anticuerpos anti-Fas y en células T citotóxicas (CTL). Así, la muerte celular en CTLs y por Fas, se lleva a efecto y es dependiente de la vía de transducción de Bcl-2.⁶⁷ Varias citocinas modulan los niveles de Bcl-2 y de Bcl-X_L en las células; estas incluyen: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β y TNF- α . Bcl-2 y Bcl-X_L e impiden la apoptosis al formar canales de iones y por interacción molecular. CED-4 y su equivalente en los mamíferos, Apaf-1, pueden unirse a Bcl-2 y a Bcl-X_L. Estas moléculas, activan proteasas de cisteína.⁶⁸

La proteína Bcl-2, disminuye el potencial de la membrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$), un evento temprano en la apoptosis. Se asocia con la formación de poros por complejos multiproteicos en la membrana.⁶⁹ Así, la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria se incrementa a los solutos de < 1500 Da y regula la homeostasis del calcio.⁷⁰ La expresión aumentada de Bcl-2 impide la perturbación del $\Delta\psi_m$. El transporte de proteínas, es otra posibilidad para la función de Bcl-2. ej. citocromo c, la cual, al encontrarse en el citoplasma forma el apoptosoma (procaspasa 9-Apaf-1- citocromo c),⁷¹ un activador de las caspasas.

El protooncogen *c-myc* codifica para c-Myc y propicia su unión específica al DNA. En casi todos los cánceres, su expresión se eleva o se altera su regulación.

El *c-myc*-mRNA y la proteína, se elevan en las células en proliferación.⁷² La proteína *c-Myc* es un factor de transcripción y su alteración se asocia con la imposibilidad de la célula para suprimir el ciclo celular y con la supresión del proceso de diferenciación. Los genes relacionados con el crecimiento celular son blanco de *c-Myc*, promueven la proliferación de la célula e impiden la detención del ciclo celular. Además, sensibilizan la célula a la apoptosis. La célula que entra al ciclo celular sobrevive, si se suprime su muerte por factores de sobrevivencia, esto previene un crecimiento celular sin control y la formación de tumores.⁷³

La proteína p53, participa en la respuesta al daño del DNA y mantiene la integridad del genoma. La interacción p53-DNA, debe estar presente, para efectuar la función de p53 como activador que inhibe la transcripción; también actúa en la regulación de la síntesis y reparación del DNA. La pérdida de la función de p53, permite a la célula una supervivencia inapropiada. Esta alteración propicia la carcinogénesis. Las proteínas E1A y E1B de adenovirus, transforman oncogenes⁷⁴ y son activadas por el gen *Ras*. La proteína E1A, promueve la proliferación y la entrada de la célula a la fase S y aumenta la susceptibilidad a la apoptosis. Durante esta fase se requiere la participación del gen p53.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1.3.- Mecanismos de la Apoptosis.

La regulación de la apoptosis en mamíferos, involucra muchas más moléculas que participan en señales en los estadios iniciales del proceso.⁷⁵ Los mecanismos moleculares de la apoptosis en humanos presentan varias etapas, i.e. en el daño al DNA inducido por la radiación, se detiene el ciclo celular y una vez reparado el daño, el ciclo puede continuar o si éste fue acentuado, la célula efectúa la apoptosis. La existencia de varias vías para la apoptosis, es una ventaja biológica para la protección de las células. Cuando ciertos grupos de células inician la apoptosis ante un estímulo, se evita la eliminación de otras células.

En el sistema inmune los ligandos y los receptores para apoptosis, eliminan células dañinas para el cuerpo. Al unirse un receptor para células de una célula T_c citotóxica, a un péptido extraño (ej. un fragmento de una proteína viral), el cual se presenta al complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase I, de una célula presentadora de antígenos, se induce la expresión de la proteína ligando Fas (Fas L) en la superficie de la célula T. El ligando Fas L, se une a la molécula, activa Fas e inicia la vía intracelular para la apoptosis, que termina con la célula infectada presentadora del antígeno.

Un mecanismo similar, protege a linfocitos T con receptores defectuosos que se unen a autoantígenos como si fueran antígenos extraños.¹⁹³⁻¹⁹⁴ La eliminación insuficiente de las células T autoreactivas, puede causar enfermedad por autoinmunidad. La remoción de un factor para la supervivencia de la célula, puede iniciar específicamente la apoptosis. Esto sucede en ausencia de señales citoplásmicas a partir del receptor de la superficie; ej. el receptor para IL-2 privado de IL-2 inicia el proceso de apoptosis.⁷⁶ La cascada de caspasas 'ríe abajo' que realiza la apoptosis, se activa: el complejo Fas-FADD, y a la caspasa 8 para realizar la parte central del proceso. Estas enzimas proteolíticas funcionan de manera similar a la cascada del complemento o de la coagulación de la sangre. Los substratos en el humano incluyen proteínas del núcleo y del citoplasma estas participan en la reparación y en la replicación del DNA, en la estructura del citoesqueleto que ayuda a la separación del RNA y en la división de la célula.⁷⁷

La fagocitosis y la degradación de los cuerpos apoptóticos completan el proceso que incluye la regulación río arriba de la trombospondina y la presentación de fosfatidilserina en la superficie de la célula y permite el 'reconocimiento' de células en apoptosis por otras células y su fagocitosis. La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos con sus membranas citoplásmicas íntegras, impide la liberación de componentes proinflamatorios del citoplasma.

1.2.- CANCER

1.2.1.- El concepto y origen del cáncer.

El cáncer es una enfermedad que se origina a partir de las consecuencias de lesiones genéticas. Estas lesiones a su vez resultan en la activación de proto-oncogenes y/o de la pérdida de la función de genes que suprimen tumores.

Las células cancerosas sobreviven con daño genético, a la vez, conservan el potencial para dividirse. Este proceso puede ser promovido por la naturaleza específica de lesiones genéticas. En el cáncer del humano, los proto-oncogenes se asocian a la producción de cáncer por mutaciones puntuales, por amplificación genética o por translocación de cromosomas.

Los proto-oncogenes son genes celulares normales que codifican para proteínas citoplásmicas y del núcleo, las cuales son responsables de los programas de proliferación y diferenciación en las células normales. También codifican para una gran variedad de proteínas involucradas en la mitogénesis o división celular, las cuales se organizan en una cascada de reacciones moleculares con respuesta celular. Los proto-oncogenes, se vuelven oncogenes cuando su producto proteico es anormal, o cuando existe un defecto cuantitativo en la transcripción del gen y actúan en cascada para la transducción de señales intracelulares.^{7B} En la Tabla 6 se muestra la lista de los oncogenes.

Los genes supresores de tumores también se denominan anti-oncogenes. Su existencia se dedujo de la pérdida de porciones de cromosomas, y de productos genéticos específicos requeridos en el desarrollo de la carcinogénesis.

El cáncer se presenta en forma hereditaria o esporádica. Los genes que suprimen tumores, causan cáncer por transmisión genética recesiva; un alelo

TABLA 6

LISTA DE ONCOGENES

Retrovirus Animal

Tumor noviral

CLASE I : FACTORES DE CRECIMIENTO

sis Sarcoma del simio

CLASE II : RECEPTORES

fms Sarcoma felino
erbB Eritroblastosis en aves
neu (o erbB-2) Neuroblastoma
ros UR II sarcoma de las aves
erbA Eritroblastosis en aves

CLASE III : TRANSDUCTORES INTRACELULARES

src Sarcoma de Rous en aves
yes Sarcoma Yamaguchi, aves
fps (fes) Sarcoma Fujinami (aves)
abl Leucemia murina Abelson Lucemia
met mieloide crónica
 Osteosarcoma murino

mos Sarcoma murino Moloney
raf (mil) Sarcoma murino 3611
 Ha-*ras* Sarcoma murino Harvey Vejiga, mama y
 cancer de piel
Ki-ras Sarcoma murino Kristen Cancer de
 Pulmón y Colon
N-ras Neuroblastoma
 y leucemias
crk Sarcoma viral en aves

CLASE IV : FACTORES NUCLEARES DE TRANSDUCCION

jun Sarcoma viral en aves 17
fos Osteosarcoma FBJ
myc Mielocitomatosis MC29
N-myc Neuroblastoma
myb Mieloblastosis en aves Leucemia
ski En aves SKV 770
p53 Transformación celular
rel Reticuloendoteliosis, aves
RB Retinoblastoma

normal parece ser suficiente para 'proteger' contra un cáncer en particular, ej. el gen del retinoblastoma codifica para la síntesis de una proteína de 105 kD (p105^{Rb} ó pRb), la cual se expresa en el núcleo celular. Esta proteína, una vez fosforilada, se une al factor de transcripción E2F (+DP) y participa en el control de la transición de la fase G1 a la fase S durante el ciclo celular.

Las anomalías causadas en el gen Rb son importantes para el desarrollo de sarcomas (osteosarcomas), con presentación de simetría bilateral. El gen pRb es inactivado (secuestrado) por proteínas transformadoras de virus DNA tumorales, como el virus SV 40 y el virus del papiloma. Los genes pRb y p53 (éste último también es inactivado por proteínas virales), requieren de inactivación antes de la transformación completa de la célula causada por el virus.

1.2.2.- El proceso de estadios múltiples en el cáncer.

Con el uso de modelos experimentales en animales para inducción de cáncer por agentes químicos, se estableció que el proceso de carcinogénesis ocurre en dos episodios por separado: la iniciación y la progresión del cáncer⁷⁹. El primer estadio es rápido y el DNA se altera por una mutación que induce la transformación de la célula y la vuelve inmortal. El segundo estadio consiste en un cambio lento y progresivo el cual promueve la proliferación de la célula y más tarde la invasión del tejido adyacente y las metástasis.

Los diferentes tipos de cáncer se desarrollan por un proceso similar de pasos múltiples. Los arreglos del genoma en las células cancerosas, sugieren la adquisición de inestabilidad del DNA.⁸⁰ En la biología de los tumores, se reconocen dos tipos de inestabilidad del DNA, en el primer tipo hay clonas de células aneuploides con duplicación de cromosomas y en el segundo tipo hay tumores diploides con inestabilidad de los loci de microsatélites.

1.2.3.- La Apoptosis y el Cáncer.

El control genético de la muerte celular programada, inició la explicación de la ausencia de respuesta en las células cancerosas a las señales de la muerte celular por la alteración en el genoma. Muchos de los proto-oncogenes y de los genes que suprimen tumores, se encuentran alterados durante la carcinogénesis, y participan en la regulación de la apoptosis.

Las células cancerosas presentan cambios debido a mutación o por pérdida de oncogenes y antioncogenes. La expresión genética anormal, se presenta en los genes bcl-2, p53, myc, o en ras y alteran el programa genético para la eliminación de las células. Otros cánceres tienen cambios en el ligando molecular APO-Fas y en receptores para el factor de necrosis tumoral o TNF, otros tumores, presentan a la vez cambios en la actividad de las proteasas de cisteína (caspasas) o en la vía de transducción para la apoptosis de los lípidos, ceramida-esfingomielina.⁸¹⁻⁸² El daño al DNA con la activación resultante del gen p53, propicia la eliminación de células con potencial de mutación e induce en ellas la detención prolongada en el ciclo celular. Estos retrasos del ciclo celular se denominan colectivamente puntos de restricción (checkpoints), para la integridad del DNA. La alteración en estos puntos de restricción del ciclo celular, establece la inestabilidad del genoma y también, la probabilidad del potencial de transformación cancerosa.

La pérdida del gen p53, crea inestabilidad del genoma y la aparición de más células dañadas con aberraciones y mutaciones en los cromosomas, las cuales sobreviven y se replican. El gen p53, participa así en la formación y en la proliferación del cáncer.⁸³ El gen CHK2, se halla acoplado a las respuestas del daño al DNA. Su función es compatible con la integridad de los puntos de restricción del ciclo celular, indispensable para prevenir el desarrollo de cáncer.⁸⁴

La translocación del gen bcl-2 (inhibidor de la apoptosis) al locus de inmunoglobulina, aumenta su expresión en el linfoma folicular humano.⁸⁵ La

función biológica de la proteína de 26 kD codificada por este gen, incrementa la vida de las células dependientes de interleucina-3, en ausencia de la citocina y así, las células entran a la fase G₀ o fase quiescente, del ciclo celular. La expresión aumentada del gen *bcl-2*, incrementa la supervivencia de las células aún en presencia de diversos estímulos nocivos: drogas genotóxicas, radiación ionizante y de hormonas glucocorticoides.⁸⁶⁻⁸⁷

La expresión aumentada del gen *myc* puede cooperar con *bcl-2* para promover la génesis de linfomas. Otros oncogenes como *ras*, son necesarios para completar la transformación maligna.⁸⁸ Los tumores que expresan *bcl-2*, pueden considerarse como quimioresistentes o radioresistentes, y de pronóstico clínico pobre.

El gen *Fas/APO-1* se expresa irregularmente en muchas líneas celulares de tumores hematológicos y epiteliales y algunos tumores no lo expresan.⁸⁹ En la mayoría de los tipos de cáncer humano, la vía de transducción *Fas/APO-1*, no es funcional y algunas células pueden presentar susceptibilidad al estímulo de crecimiento después de ser sometidas a tratamiento con anti-*Fas*. El gen *Fas L* se expresa en algunos linfomas NK y en las leucemias linfocíticas de células T y en líneas celulares de cáncer del colon.⁹⁰

1.2.4. La Apoptosis en la Patogenia del Cancer.

Los modelos de estudio de la 'proliferación celular' en el cáncer son ya inadecuados y el estudio de la apoptosis ha abierto una dimensión nueva para la investigación y el tratamiento del cáncer.⁹¹ La apoptosis es de importancia crucial en la patogénesis del cáncer y en la posible resistencia a los tratamientos convencionales con agentes antineoplásicos. Las mutaciones en el gen *p53* y en sus genes reguladores (*mdm2*), ocurren entre el 55% y 70% de los tipos de

cáncer. Las personas que heredan un defecto en una de sus dos copias desarrollan una frecuencia muy elevada del cáncer (síndrome de Li-Fraumeni) .⁹² Los tumores presentan cantidades variables de células en apoptosis. ⁹³ Existe correlación entre la proporción elevada de células en apoptosis y la disminución en el crecimiento tumoral. Los ratones que presentan ausencia de los genes que codifican para la proteína Bax, desarrollan tumores con crecimiento rápido; estos últimos muestran células en apoptosis con 50% menor que los tumores similares de los ratones con genes normales que codifican para la proteína Bax.⁹⁴ El gen Bax, funciona aparentemente a través de una vía apoptótica independiente del gen p53 durante la carcinogénesis del colon con variedad de la mutante de microsatélite.⁹⁵ De ahí que existe la posibilidad del funcionamiento de varias vías para la apoptosis, aún en las células cancerosas.

Las mutaciones en los genes que llevan a las células hacia una reducción en la apoptosis, en forma directa o indirecta, se asocian generalmente con un pronóstico clínico más pobre.⁹⁶ La investigación en la terapia del cáncer cuya meta es la inducción de la apoptosis, ha renovado la búsqueda de nuevas formas de quimioterapia con diseño racional, altamente específico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1.3.- LA APOPTOSIS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CANCER

1.3.1.- Las células susceptibles mueren por apoptosis.

La apoptosis, contribuye directamente a la respuesta terapéutica del cáncer con el uso de la radiación y con la quimioterapia. Se ha reportado que la apoptosis (índice apoptótico), puede predecir la sensibilidad de los tumores a la radiación o correlaciona con la respuesta clínica a la quimioterapia.^{97,98} Una lista de compuestos quimioterapéuticos inductores de la apoptosis, se presenta en la Tabla 7,⁹⁹⁻¹⁰³. La apoptosis se ha observado en líneas celulares en cultivo en timocitos normales, en linfoma, tumores epiteliales del ovario, de leucemia, de adenocarcinomas entre otras. La hipoxia tumoral, la radiación ionizante, la supresión del estímulo hormonal, han mostrado la producción de apoptosis.¹⁰⁴⁻¹⁰⁹ La apoptosis en estos casos, se ha documentado por medio de criterios morfológicos, por la presencia de degradación del DNA, análisis por citometría de flujo del contenido de DNA y varios otros criterios bien definidos.¹¹⁰⁻¹¹⁴

El efecto de la inducción de apoptosis *in vivo*, con el uso de agentes quimioterápicos, se ha reportado en estudios diversos: el uso de ácido retinoico en linfoma de células T;¹¹⁵ la combinación de radiación y de quimioterapia (5-FU, cisplatino y bleomicina), en el tratamiento de carcinoma epidermoide del esófago,¹¹⁶ el uso de quimioterapia experimental en tumores murinos con cis-platino, ciclofosfamida y otros agentes en el adenocarcinoma, en el linfoma, en sarcomas y en carcinomas epidermoides.¹¹⁷ El efecto apoptótico fue observado igualmente en adenocarcinomas de la glándula mamaria y del ovario en ratones con la administración de ciclofosfamida.¹¹⁸ El etopósido, m-AMSA y Ara-C, produjeron apoptosis en células tumorales de pacientes con leucemia aguda.¹¹⁹

TABLA 7

AGENTES ASOCIADOS CON APOPTOSIS			
Etopósido	VM26	m-AMSA	Dexametasona
Vincristina	cis-Platino	Ciclofosfamida	Adriamicinna
Paclitaxel	5-F.U.	5-F.D.	Camptotecin
Hidroxiurea	Ara-C	5-Azacitidina	Mostaza Nitrogenada
Metotrexate	Clorambucil	Bleomicina	
BCNU	Actinomicina	Melfalán	

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.3.2.- Los mecanismos de la apoptosis inducida por quimioterapia.

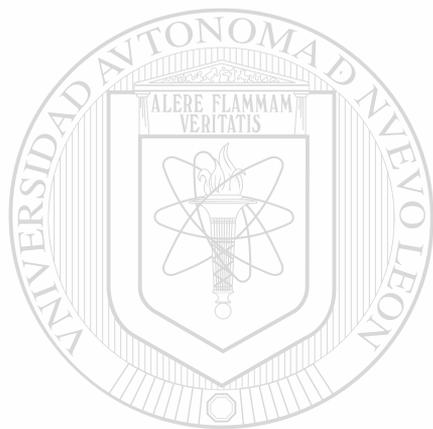
Los agentes quimioterapéuticos operan en los mecanismos de regulación de la apoptosis. La degradación proteolítica de la polimerasa de poli-ADP ribosa (PARP), se identificó en respuesta al agente etopósido ¹²⁰ resultante de la activación de una proteasa específica, que precede a la degradación del DNA. ¹²¹

La proteasa para PARP, es central en la apoptosis por quimioterapia. Ha recibido varios nombres: CPP-32, pRICE, Yama y apopain. ¹²²⁻¹²⁴ Muchos inductores de apoptosis, incluyendo las citocinas y agentes quimioterápicos, llevan a la activación de ésta y de otras proteasas lo cual inicia la muerte celular.

Un grupo grande de estudios, han establecido el papel de la apoptosis en la interacción de los agentes quimioterapéuticos con moduladores de la apoptosis; la expresión aumentada de Bcl-2 inhibe la apoptosis *in vitro* al etopósido, metilmetanosulfonato, N'-metil-N' nitrosourea, dexametasona, camptotecin, doxorubicina, 4-hidroxi-peroxi-ciclofosfamida, vincristina y actinomicina D. ¹²⁵⁻¹³² La reducción en la expresión de Bax, un homólogo del gen Bcl-2, se asocia a una respuesta limitada durante la combinación de quimioterapia y a la disminución en supervivencia de las pacientes con cáncer glándula mamaria y metástasis. ¹³³ Los agentes quimioterapéuticos como el Ara-C, la vincristina, la daunorubicina y la radiación, causan la acumulación de ceramida. ¹³⁴⁻¹³⁷ El uso de radiación presenta activación de una esfingomielinasa ácida y en ratones con ausencia de ésta enzima, hay resistencia a la apoptosis inducida por radiación en el pulmón. ¹³⁸

Otros moduladores, actúan en la apoptosis inducida por quimioterapia: la citotoxicidad en la quimioterapia inducida por vincristina, adriamicina, Ara-C y ciclofosfamida, puede inhibirse por factores del crecimiento hemopoyético como el factor estimulante de granulocitos y de macrófagos o por IL-6. ¹³⁹ La alteración en el gen p53, 'protege' a las células del carcinoma de la glándula mamaria, de la apoptosis inducida por cis-platino ^{140,141} y BCR-ABL, protege de la apoptosis

inducida por varios agentes quimioterapéuticos.¹⁴² La proteína BHRF1 del virus Epstein-Barr, la cual muestra homología estructural y funcional con Bcl-2, protege a las células de la apoptosis inducida por etopósido y por cis-platino¹⁴³⁻¹⁴⁵ y la expresión de bcl-x modula la sensibilidad a fármacos en el neuroblastoma mamario y en las células prolinfocíticas.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Los oncogenes ras y mdm2 participan en la apoptosis inducida por quimioterapia en el rhabdomyosarcoma y en el glioblastoma respectivamente.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4.- PEROXISOMICINA A1

1.4.1.- Antecedentes.

El compuesto T-514, denominado también peroxisomicina A1 (PA1) (Figura 2), es una antracenona dimérica, extraída de plantas del género *Karwinskia* y debe su nombre a la acción que presenta sobre la integridad de los peroxisomas.¹⁵¹

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia Rhamnaceae y se halla constituido por 15 especies de arbustos y árboles pequeños. Su hábitat natural se localiza desde el sur de los Estados Unidos de América (en los estados de Texas y Nuevo México), México, la América Central, la parte Norte de Colombia, Cuba, Haití y la República Dominicana. En México existen 12 especies distintas de este arbusto¹⁵² y la planta *Karwinskia humboldtiana* es la que prevalece en extensión. La ingestión accidental del fruto de la planta fue publicada en un estudio toxicológico a finales del siglo XVIII.¹⁵³ En varios estudios relacionados con las manifestaciones clínicas como consecuencia de la ingestión del fruto de la planta *Karwinskia humboldtiana*, se han referido al daño a los órganos, aparatos y sistemas.¹⁵⁴⁻¹⁵⁸

La caracterización de las sustancias responsables de los efectos tóxicos^{159,160} de *Karwinskia humboldtiana* ha sido también motivo de estudio. En 1975 se aislaron e identificaron cuatro antracenonas diméricas, denominadas T-496, T-514, T-516 y T-544, en base a su peso molecular.¹⁶¹

El aislamiento, la caracterización y la obtención de los diversos compuestos de las plantas de éste genero, se han efectuado en condiciones óptimas¹⁶² y actualmente se encuentran disponibles en forma purificada.¹⁶³

Los estudios experimentales realizados se han enfocado a los siguientes aspectos:

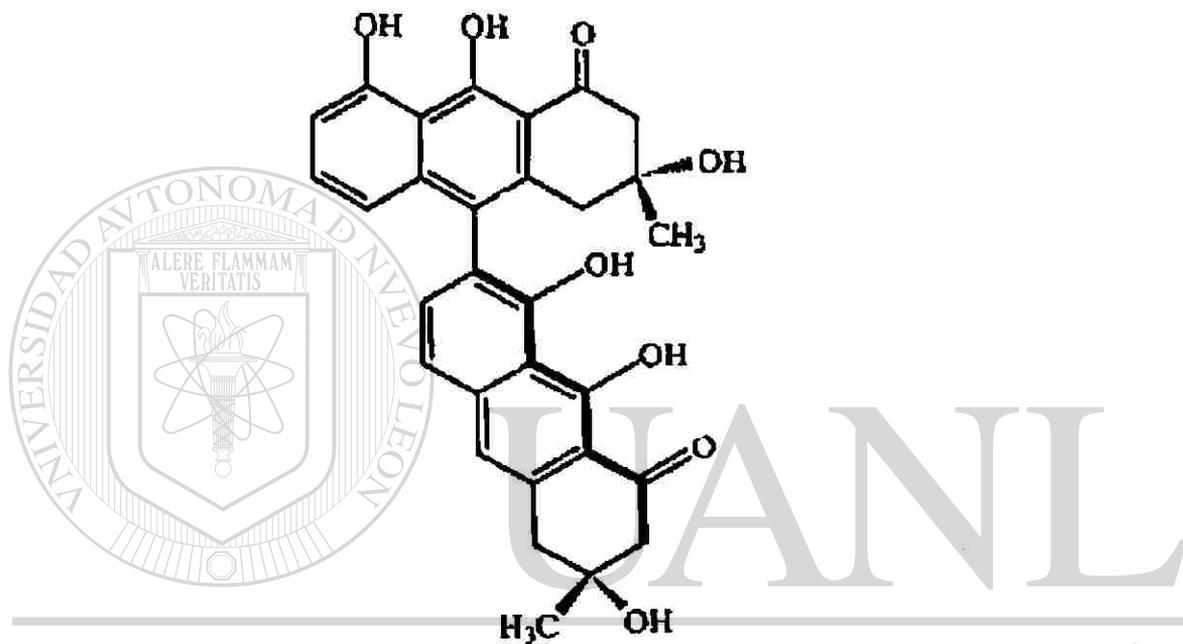


Figura 2. Estructura química
del compuesto peroxisomicina A1 (T-514)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

a).- La toxicidad aguda en ratones con el fruto molido de la planta *K. humboldtiana* y con las toxinas puras T-496, T-514 y T-544. En estos estudios los animales intoxicados, presentaban lesiones hepáticas y pulmonares, como causa de la muerte. Con el uso del compuesto T-514 o PA1, el efecto tóxico fue en hígado, pulmón y riñón y la T-544 produjo daño a los nervios periféricos. Con la administración del compuesto T-496 se observó un efecto catártico en los animales estudiados.^{164,165} El uso del compuesto diast T-514 o PA2, en animales, replicó el daño a los órganos blanco causado por la PA1.¹⁶⁶

b).- Los ensayos *in vitro* para citotoxicidad de los compuestos PA1 y PA2.^{167, 168} en cultivos primarios del hígado y en piel de rata, presentaron mayor sensibilidad de los hepatocitos a la T-514 y a la T-544. La hepatotoxicidad de la PA1 (T-514) fue mayor en estos estudios. El daño selectivo e irreversible a los peroxisomas de levaduras *in vivo*,¹⁶⁹ así como un efecto inhibitorio de la PA1 sobre la actividad de la catalasa hepática *in vitro* han sido señalados, sin embargo no hubo inhibición sobre la catalasa tisular *in situ e in vivo*.¹⁷⁰

c).-Intoxicaciones accidentales en humanos: en casos individuales y estudio de familias , al ingerir el fruto^{171,172}; han referido el cuadro clínico, que consiste en un síndrome neurológico de parálisis ascendente el cual puede progresar a la muerte por daño al bulbo raquídeo.

d).-En un estudio se demostró la ausencia de daño genotóxico en linfocitos, sin embargo, la proliferación celular se encontró afectada por el compuesto PA1; la actividad citostática fue independiente del daño genotóxico al medir el índice de mitosis y la cinética de proliferación celular.¹⁷⁵

e).- La distribución subcelular en fracciones preparadas del hígado de rata: en el núcleo, en las mitocondrias, en los peroxisomas y en los microsomas fue homogénea y se concluyó, que el compuesto PA1 (T-514), puede pasar a través de las membranas de los compartimentos subcelulares con ausencia de selectividad hacia algún organelo celular en particular. Igualmente se propuso que éste compuesto puede actuar como un inductor microsomal en virtud del hallazgo de niveles importantes de proteína en los homogenados de hígado y del incremento en la actividad de la enzima NADPH-reductasa del citocromo P450 y

que éste incremento podría provenir de la interacción entre la PA1 con el sistema microsomal redox de ciclaje.¹⁷⁶

f).- La determinación de las dosis letales DL₅₀ para el compuesto PA1, en diferentes especies animales, presentó una pendiente muy inclinada en la curva dosis-respuesta.¹⁷³ Estos resultados indican una variación biológica estrecha.¹⁷⁴ Los resultados de citotoxicidad y la pendiente de letalidad, permitieron el planteamiento inicial de que al existir toxicidad selectiva entre células de origen benigno y maligno, el compuesto PA1 (T-514), podría tener un efecto antineoplásico. Lo anterior fue demostrado en líneas celulares neoplásicas *in vitro* de tumores de pulmón, de colon y del hígado.

g).- La administración de dosis subletales de PA1 altera la integridad de los peroxisomas en levaduras metilótropicas (*Hansenula polymorpha* o *Candida boidinii*),¹⁵¹ con daño resultante en la membrana peroxisomal y alteración en su funcionamiento y salida de las proteínas principales al citosol. En base a este efecto específico de la PA1 (T-514) en los peroxisomas, el compuesto recibió el nombre de peroxisomicina A1.

— Actualmente, el compuesto PA1, se halla en estudios fase clínica I, sin embargo, su mecanismo de acción, aún no se ha determinado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4.2.- Importancia y originalidad del estudio.

Los resultados clínicos afirman que la quimioterapia antineoplásica no daña en forma selectiva las células con división rápida¹⁷⁷ y que las células cancerosas presentan resistencia al tratamiento con cierta frecuencia.¹⁷⁸ El concepto de Apoptosis es actualmente un paradigma científico^{179,180} y ha realizado un cambio significativo en el pensamiento acerca del origen, del desarrollo y del tratamiento del cáncer en particular.¹⁸¹ El conocimiento de los mecanismos que regulan la Apoptosis, ha mostrado que los agentes quimioterapéuticos operan por esta vía para causar la muerte programada de las células cancerosas.¹⁸²

Virtualmente todos los fármacos quimioterapéuticos que se incluyen en la Farmacopea, pueden inducir Apoptosis y la estrategia racional para utilizar la muerte celular programada como herramienta terapéutica es que la apoptosis contiene una vía de acción altamente regulada con una variedad de sitios para la intervención farmacológica. El desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el cáncer, o de regímenes de tratamiento, puede investigarse a partir de la búsqueda de sitios 'blanco' específicos en los diversos procesos celulares, que se relacionan con el fenómeno de apoptosis. Estos procesos incluyen: la replicación del DNA, la polimerización de las proteínas del citoesqueleto, la activación transcripcional de los genes asociados a la apoptosis y la fosforilación de las proteínas que inducen el programa de la apoptosis en las células resistentes a la quimioterapia. Las células presentan gran variación en su susceptibilidad a la apoptosis y la respuesta a este proceso en diversos tipos celulares, depende en parte, de factores epigenéticos del desarrollo y del medio ambiente.^{183,184}

El compuesto PA1 (T-514) es un candidato importante para probar su actividad farmacológica a nivel celular y molecular en células cancerosas a través del fenómeno de Apoptosis en virtud de su citotoxicidad selectiva hacia células tumorales "in vitro" y del interés por conocer su mecanismo de acción. El fenómeno de Apoptosis, ofrece un mecanismo explicativo adecuado para la acción del compuesto PA1 y para su utilización potencial como agente quimioterápico del cáncer. La comprobación de la acción de agentes farmacológicos que intervengan tanto en el ciclo celular como en otros mecanismos que afectan el compromiso de las células cancerosas para entrar ya sea a la fase de mitosis o a la Apoptosis es de gran importancia actual en la quimioterapia del cáncer.¹⁸⁵

Los hallazgos morfológicos compatibles con la Apoptosis encontrados en estudios de bioensayos con la PA1 y PA2^{165,166} y los resultados de ensayos piloto realizados en células de Chang y en explantes de tejido hepático de ratas Wistar que mostraron cambios celulares asociados a la Apoptosis han precedido al planteamiento de la presente investigación.

En el presente estudio, se propone investigar las propiedades apoptóticas de la PA1 (T-514), *in vitro* como mecanismo posible de acción para el efecto del este compuesto en la quimioterapia del cáncer.

HIPOTESIS

“La acción del compuesto Peroxisomicina A1 (T-514) en células eucariotes *in vitro*, es mediada a través del fenómeno de Apoptosis”.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades apoptóticas del compuesto Peroxisomicina A1 (T-514) en las células eucarióticas en estudios *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Estudiar la sensibilidad de las células eucariotes al compuesto Peroxisomicina A1, "in vitro".
- 2.- Indagar el efecto de la Peroxisomicina A1 relacionado con la Apoptosis, en cultivos de células eucariotes "in vitro".
- 3.- Determinar el efecto de la Peroxisomicina A1 sobre el DNA relacionado con la Apoptosis, en ensayos "in vitro".
- 4.- Determinar el efecto del compuesto Peroxisomicina A1 en el ciclo celular, de líneas celulares normales y neoplásicas.
- 5.- Investigar el efecto de la Peroxisomicina A1 en la transducción de la vía apoptótica en líneas celulares neoplásicas de origen humano.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

PREPARACION DEL COMPUESTO PEROXISOMICINA A1.

La PA1 fue obtenida del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., de acuerdo a métodos previamente reportados.^{162, 163} Se preparó una solución stock 10 mM en DMSO y se realizaron diluciones para ajustar a diferentes concentraciones. Se prepararon soluciones frescas para cada experimento y estas fueron utilizadas inmediatamente una vez que el compuesto se disolvió en el solvente.

LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO:

Las líneas celulares fueron obtenidas de la ATCC: American Type Culture Collection; (Tabla 8) y los cardiomiocitos (usados como control interno positivo para el proceso de apoptosis) fueron cultivados en cultivo primario de acuerdo al método descrito por Simpson¹⁶⁷. Las células, se cultivaron en frascos Falcon T-25 y se mantuvieron a 37°C con los medios nutritivos específicos para cada una de ellas (Eagle, MEM, Dulbecco o RPMI 1640),¹⁶⁶ y se suplementaron con suero fetal bovino (Sigma Co.) al 10%.

Exposición de las células a la PA1 y ensayo de citotoxicidad:

Las células de cada línea celular fueron cultivadas hasta la formación de monocapa celular y posteriormente fueron tripsinizadas, añadiendo 1ml de tripsina

TABLA 8
LINEAS CELULARES

Línea celular	Clave ATCC	Origen
Jurkat	TIB-152	Leucemia humana T
HeLa	CCL-2	Cancer de cervix humano
MCF-7	HTB-22	AdenoCa de mama humano
HT-29	HTB-38	AdenoCa de colon humano
HepG2	HB-8065	Ca hepatocelular humano
293	CRL-1573	Fibroblastos embrionarios transformados por adenovirus 5 (humanos)
Rat 2	CRL 1764	Fibroblastos normales de embrión de rata
BALB/3T3	CCL-163	Fibroblastos embrionarios normales, ratón
3T3SV2	CCL-163.1	BALB/3T3 transformada por virus SV40

0.25% a los frascos de cultivo para el desprendimiento de la monocapa celular. La densidad celular se ajustó a 5×10^5 células/ml y se sembraron en placas de 96 celdillas en cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 24 a 48 h, hasta alcanzar una confluencia celular de 100%. Posteriormente las placas se retiraron de la incubadora y las células fueron lavadas en tres ocasiones con el medio de cultivo y expuestas a medio con PA1 en dosis de 0, 5, 10, 15, 20 y 30 μM . Las placas se incubaron a 37°C y después de 24h de exposición, las células fueron colectadas para realizar el análisis de citotoxicidad. Los criterios establecidos con los cardiomiocitos control fueron tratados con PA1 (15 μM) y teñidos con los colorantes fluorescentes, yoduro de propidio (IP) y Hoechst 33258 fueron los siguientes: las células viables son permeables al colorante Hoechst 33258 el IP no atraviesa la membrana celular de las células vivas. Las células que mueren ya sea por apoptosis o por necrosis tienen alteración en sus membranas citoplásmicas, lo cual las hace permeables al colorante IP. Todas las líneas celulares se expusieron a los colorantes fluorocromos.

Del tratamiento con PA1 de las diferentes líneas celulares crecidas en monocapa, se obtuvieron dos poblaciones de células: adherentes y no adherentes. Para el ensayo de citotoxicidad, las células no adherentes fueron colectadas a partir de las placas de cultivo y las células adherentes restantes una vez tripsinizadas, se obtuvieron por separado. En el caso de las células Jurkat, estas fueron sembradas en suspensión a razón de 5×10^5 células/ml y la PA1, se añadió directamente al medio de cultivo. Después de 24h de incubación, las células se colectaron, se centrifugaron a 1500 rpm/min durante 5 minutos y fueron lavadas por una ocasión con 1 ml de PBS y se incubaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de IP en PBS durante 10 min. A continuación todas células se contaron en un contador de células Coulter Z2 Modelo 253.

Ensayo para Apoptosis:

Para determinar la naturaleza de la muerte celular, se utilizaron dos criterios para discriminar entre apoptosis y necrosis. Las células en monocapa, teñidas con la doble tinción: ioduro de propidio y Hoechst 32258 (para valorar la permeabilidad de la membrana) y la morfología nuclear evaluada mediante microscopia de fluorescencia. Una vez tratadas las células con PA1 a las concentraciones y tiempo ya establecidos, estas fueron lavadas con 1ml de PBS y se incubaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de IP y 1 $\mu\text{g/ml}$ de Hoechst 32258 en PBS durante 10 min en la oscuridad. Posteriormente las células fueron revisadas microscópicamente a 40x y las células con tinción negativa para el ioduro de propidio y con tinción difusa para el colorante nuclear Hoechst fueron consideradas como células necróticas. Las células teñidas negativamente con el ioduro de propidio y con tinción nuclear para el colorante Hoechst en porciones compactas y fragmentadas fueron consideradas como células apoptóticas.

Las células Jurkat y los cardiomiocitos (control interno positivo para apoptosis), crecidos en suspensión, una vez tratados con PA1, fueron lavados con PBS, y se incubaron en etanol al 50% en PBS durante 1h en hielo. A continuación, las células se centrifugaron, la pastilla se lavó con PBS se agregaron 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa y las muestras se incubaron durante 30 min a 37° C. Posteriormente se añadieron 40 $\mu\text{g/ml}$ de IP a la suspensión celular y las células se incubaron adicionalmente durante 10 min. Las muestras incubadas se analizaron por citometría de flujo en un scanner B-D (FACScan) con el programa Lysis II.¹⁸⁹

Análisis del Ciclo Celular:

Las fases del ciclo celular se analizaron en las células las cuales fueron lavadas por una ocasión en PBS y se incubaron en etanol al 50% en PBS durante

1h sobre hielo. A continuación, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con 1 ml de PBS y fueron incubadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente se añadieron 40 $\mu\text{g/ml}$ de IP a la suspensión de células y se incubaron durante 10 minutos. El contenido del DNA de las muestras celulares se analizó por citometría de flujo en un scanner B-D (FACScan) con la utilización del programa Lysis II.

Cultivo y ensayo de viabilidad celular en células HL-60 y HL60/MX2.

Las células HL-60 y HL-60/MX2 (ATCC) de leucemia promielocítica humana, fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de FBS, glutamina (2mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$). La citotoxicidad del compuesto fue evaluada por medio del ensayo de proliferación de Promega (Cell Titer 96^R AQueous). Las células se sembraron en placas de microcultivo de 96 pozos y se expusieron a la PA1: (0.01, 0.02, 0.005, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 μM), en un volumen de 100 μl . Después de 72 h de incubación a 37°C se añadieron 20 μl de MTS a cada pozo y las muestras se incubaron durante 2 horas más, a 37°C. Las muestras de las placas, se analizaron espectrofotométricamente con el Multiskan Labsystems MS tipo 352 a una longitud de onda de 492 nm. Se utilizaron el etopósido y camptotecin (Sigma Co.) como controles positivos. El resto de los reactivos fueron grado analítico.

Análisis del Ciclo Celular.

El análisis por citometría de flujo del contenido de DNA se realizó en las células HL-60 1×10^6 células/ml, fueron expuestas a la PA1 (a las concentraciones

señaladas para viabilidad celular), durante 24 h y posteriormente fueron lavadas en tres ocasiones con solución amortiguadora de citratos. La pastilla celular se centrifugó y se incubó con 250 μ l de solución de tripsina con 200 μ L de solución amortiguadora de citratos y 5 μ g/ml de inhibidor de RNAsa durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 200 μ l de IP a una concentración de 125 μ g/ml. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan Becton Dickinson y se utilizó el programa Lysis II para determinar el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. La longitud de onda de excitación para el IP fue de 488 nm y la de emisión de 620nm (FI-3).

Ensayo de degradación de PARP.

Las células HL-60 (7×10^5), se cultivaron en medio libre de suero y se expusieron a la PA1 a las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 μ M, durante 24 h a 37°C. Una vez tratadas, las células se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 min y el botón celular fue resuspendido en 3 ml de solución amortiguadora de lisis que contenía 25 mM de PBS, 0.1mM PMSF, y 5 μ g/ml de quimostatina, leupeptina, aprotinina y pepstatina A.

La pastilla celular se suspendió en la solución amortiguadora de carga (50 mM de Tris-HCl a un pH 6.8, 15% de sacarosa, EDTA 2 mM, SDS 3% y azul de bromofenol 0.01%). La mezcla se expuso a ultrasonido durante 30 segundos a 4°C y a continuación se hirvió a 100°C durante 3 minutos. Para el ensayo de Western Blot, las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con 0.1% de SDS y posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) Hybond-C durante 40 min a 150 mA para lo cual se utilizó un sistema de transferencia semi-seco. A continuación las muestras fueron bloqueadas, con leche ligera al 10% en PBST (0.1% Tween-20, 25 mM en solución amortiguadora de fosfato a un pH de 7.4) durante 30 min. Posteriormente las muestras se

incubaron con anticuerpo monoclonal anti-PARP (Clontech, Palo Alto CA), (la dilución empleada fue 1:10,000 en PBST suplementada con 100 μ l de leche con bajo contenido en grasa al 0.1%), durante 30 min. Los Blots se lavaron en tres ocasiones (5 min. cada vez) y se incubaron con peroxidasa conjugada a inmunoglobulinas de borrego vs. IgG de ratón (Amersham LifeSciences), (dilución de 1:10,000 en PBST con 0.1% de leche con bajo contenido en grasa), durante 30 min.

Después de tres lavados sucesivos de las muestras con PBST, se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia para Western Blot de NEN (Boston MA) para llevar a cabo la detección de las bandas, las cuales se visualizaron por autoradiografía.

Ensayo de relajación de DNA (Topoisomerasas I y II).

Para la realización del ensayo de relajación de DNA se incubaron 0.5 μ g de DNA superenrollado pKmp27 con 4 unidades de topoisomerasa humana I y II (TopoGen Inc.) a 37°C durante 1 h en solución amortiguadora de relajación (50 mM Tris pH 7.8, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, ditioneitol 1 mM, EDTA 1 mM) en presencia de 5, 10, 25, 50 100 y 200 μ M de PA1. Las reacciones se detuvieron con SDS al 0.25% y 250 μ g/ml de proteinasa K. Las muestras de DNA fueron aplicadas a una mezcla de 3 μ l de colorante para electroforesis (amido black) y se corrieron en gel de agarosa al 1% a temperatura ambiente por 2 h a 120 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 μ g/ml) y se lavaron y fotografiaron bajo luz UV.

Ensayo para degradación de sustratos de caspasas 3 y 8.

Para la realización de los ensayos de caspasa 3 y 8, se utilizaron los estuches ApoAlert (ClonTech) CPP32/caspasa-3 (CPP32, EC 2.4.2.30) y caspasa 8 y se siguió el protocolo para cada uno. En síntesis: las células HL-60 (2×10^6 cel/ml), suspendidas en 2 ml de medio RPMI 1640, fueron tratadas con 0, 0.10, 0.25, 0.50, y 1 μ M de PA1 por 24 h a 37^o C. A continuación, las células fueron suspendidas en 50 μ l de solución amortiguadora de lisis y el lisado se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 3 min a 4^o C.

A cada muestra, se le añadieron 50 μ l de solución amortiguadora de reacción suplementada con 10 mM de ditioneol y se incubaron a 4^o C durante 3 min. Se utilizó como control una muestra celular con 0.5 μ l de DEVD-fmk o z-IETD-fmk (1Mm) y estaurosporina (0.2 μ M). Las muestras se incubaron a 37^o C durante 24 h. A continuación se agregaron a los tubos: DEVD-pNA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp) o IETD-pNA (N-acetil-Ile-Glu-Tr-Asp) como sustrato (5 μ l, 50 μ M) y las muestras se incubaron 1 h a 37^o C. La formación de p-Nitroanilida, se analizó espectrofotométricamente a 405 nm en un lector para placas Labsystems Multiskan MS.

CAPITULO 3

RESULTADOS

Evaluación de citotoxicidad.

Los criterios para evaluar los resultados de citotoxicidad fueron: la propiedad de las células viables para adherirse al sustrato y la ausencia de adhesión de las células dañadas por el efecto citotóxico de la PA1. Una vez que las células se incubaron con PA1, se cuantificó el porcentaje de células no adheridas. Los resultados de citotoxicidad de la PA1 en las diferentes líneas celulares se muestran la Figura 3. Los cardiomiocitos (control para apoptosis en cultivo primario), mostraron susceptibilidad a la PA1 y fueron altamente sensibles (100%). Las líneas celulares Jurkat, HeLa y HepG2, presentaron un 90% de muerte celular. En el caso de las células HT29 y MCF-7, estas también fueron sensibles al efecto citotóxico de la PA1 y el daño citotóxico ocurrió con la dosis de 15 μM (mortalidad 80 %). El efecto de la PA1 fue menor en las células 3T3, 3T3SV2 y Rat 2 y con dosis de 20 a 30 μM se obtuvo 50 a 70% de muerte celular. Las células menos sensibles y las que presentaron resultados variables (línea celular 293), no fueron incluidas en los ensayos subsecuentes.

Ensayo para Apoptosis

En las células Jurkat cultivadas en suspensión y tratadas con la PA1, se observó en el microscopio de contraste de fases que presentaron los hallazgos morfológicos típicos de apoptosis: esto incluyó cuerpos celulares redondeados y compactos y la presencia de burbujas en el citoplasma. Las células en apoptosis

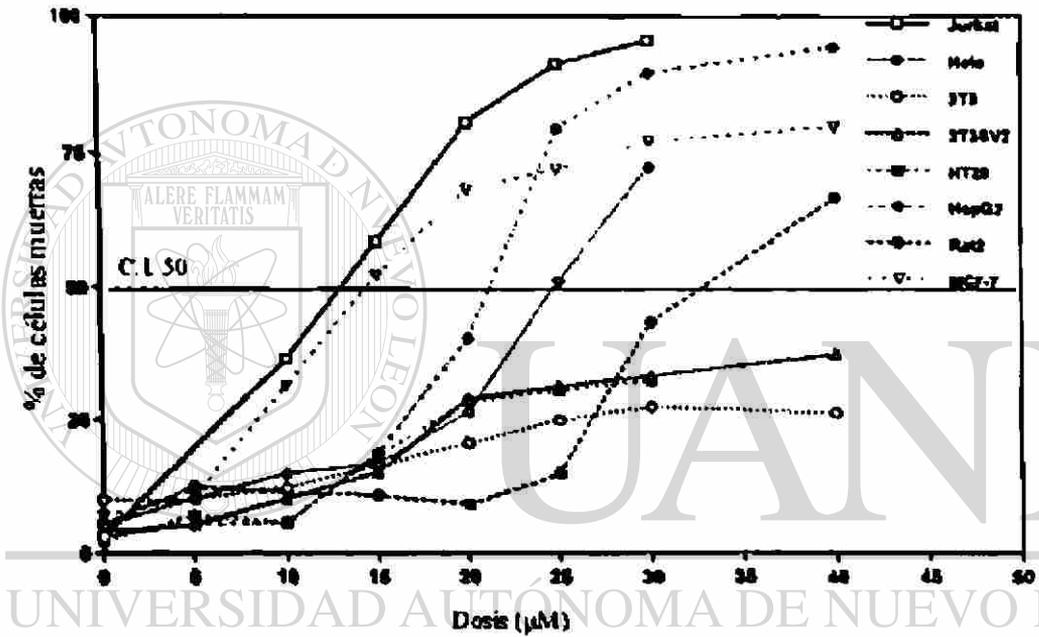


Figura 3. Citotoxicidad de la PA1 en líneas celulares de origen tumoral y normal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

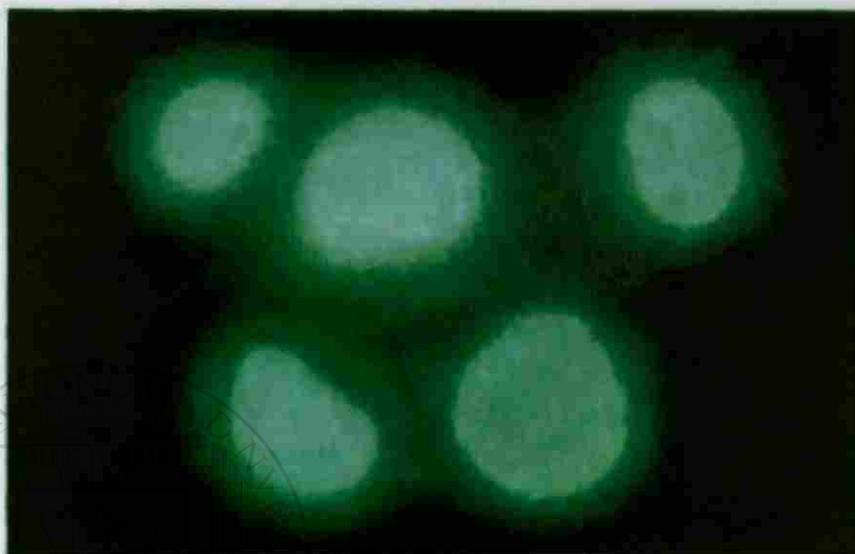
presentaban núcleos condensados o fragmentados (Fig 4), en contraste con las células necróticas que mostraron núcleos normales o con cromatina difusa a la tinción fluorescente. En los controles positivos, (cultivos de cardiomiocitos) tratados con PA1(10 μ M) se observó la presencia de necrosis y apoptosis.

En las líneas celulares Hela, Hep G2, HT29, MCF-7, 3T3, 3T3SV2 y Rat2 tratadas con PA1, se encontraron los siguientes hallazgos morfológicos de apoptosis: cuerpos celulares compactos, cromatina densa en agregados y burbujas en la membrana citoplásmica. Los resultados de la muerte celular por apoptosis se presentan en la Tabla 9.

El análisis de las células Jurkat tratadas con la PA1, mostró inducción del contenido sub- G_0 del DNA; este efecto fue dependiente de la dosis utilizada y se muestra en la Figura 5. El análisis por citometría de flujo (CF) del contenido de DNA en las células tratadas con PA1, indicó que el 40% del total de las células, tenía un contenido de DNA menor que el de G_0 . Estos resultados son característicos de apoptosis y ocurren como consecuencia de la fragmentación del DNA cromosómico, la cual se presenta específicamente durante la apoptosis.¹⁸⁹

Los hallazgos de CF en las células Jurkat cultivadas en suspensión y tratadas con PA1 se presentan en la Figura 6. La PA1, produjo apoptosis en todas las líneas celulares; la muerte celular programada fue dependiente de la dosis utilizada. A 30 μ M de PA1, se indujo la muerte de las células en más del 70% de todas las líneas celulares excepto en la línea celular HT29. En las líneas celulares no tumorales 3T3 y Rat2, 25 μ M de PA1 indujo la muerte celular en menos de 20% y 40% respectivamente.

CONTROL



APOPTOSIS



Figura 4. Células Jurkat teñidas con ioduro de propidio ($1 \mu\text{g/ml}$)

TABLA 9

**MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN LINEAS CELULARES
EXPUESTAS A PA1**

LINEA CELULAR	APOPTOSIS (Porcentaje)
Cardiomiocitos (Control Positivo)	100 %
Células Jurkat, HeLa, HepG2	90%
Células HT29, MCF-7, 293	80%
Células 3T3, 3T3SV2, Rat2	50 a 70%

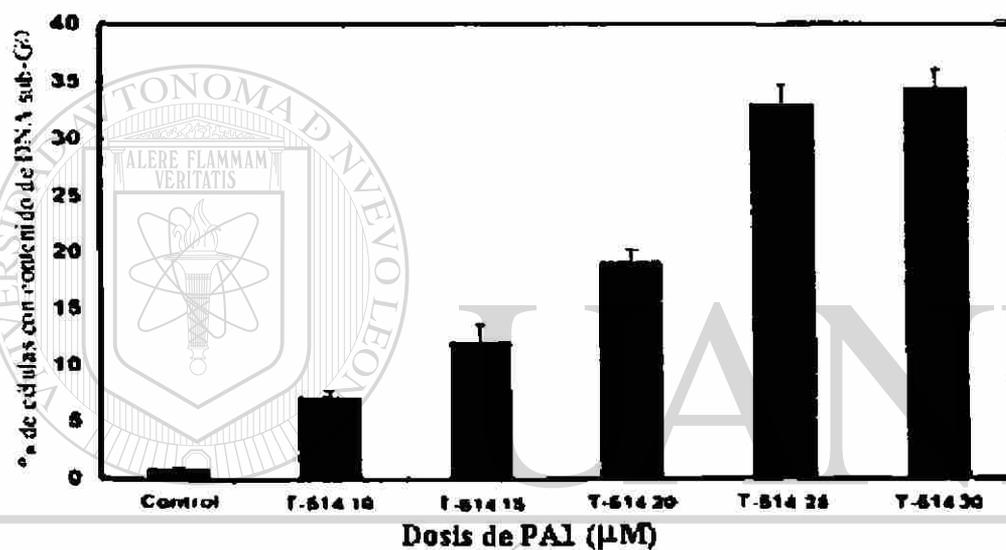


Figura 5. Inducción de apoptosis en células Jurkat por la PA1

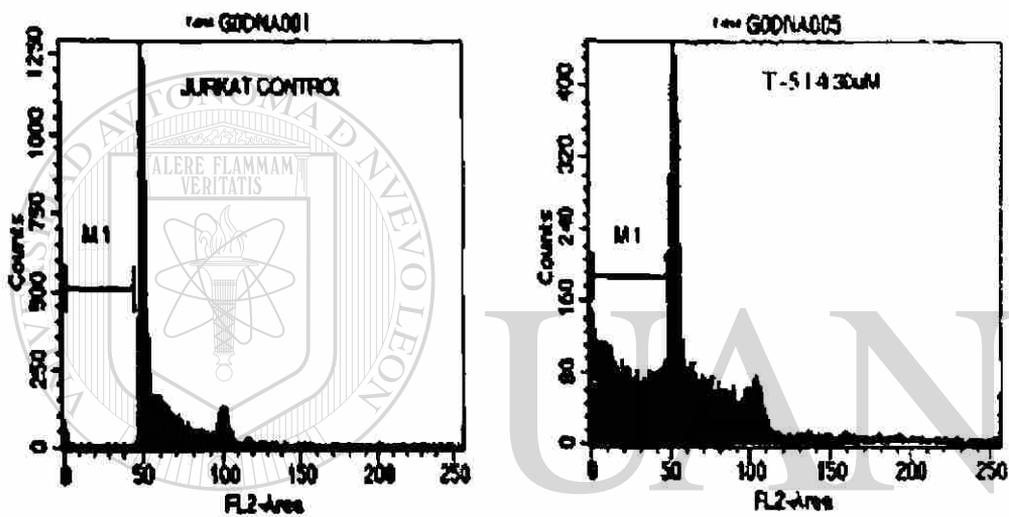


Figura 6.- Inducción de degradación del DNA cromosómico en células Jurkat expuestas a 30 μ M de PAI (FACScan).

Análisis del ciclo celular.

La detención del ciclo celular se observó al efectuar el análisis del contenido de DNA en las células Jurkat las cuales fueron las más sensibles (Figura 7), para cada fase individual del ciclo celular. Se apreció una mayor proporción de células con un contenido aumentado de DNA en la fase G₂/M, lo cual fue evidente desde el uso de la dosis de 10 μ M de PA1. Al comparar las células tratadas con PA1, que se hallaban en la fase G₂/M, con las células control, la cantidad de células en esta fase, se incrementó al doble. El número total de células tratadas con la PA1 (5 μ M), comparadas con el control, presentaron un efecto de detención en el ciclo celular.

La tasa de muerte de las células se comparó con las células control. El número de células en apoptosis, fue mayor en las células tratadas con 5 μ M de PA1 que en el control. Los mismos resultados se obtuvieron en todas las líneas (Hela, HepG2, HT29 y MCF-7) evaluadas en dos ocasiones diferentes.

La proporción de células tumorales de origen epitelial, tratadas con 5 μ M de PA1, al comparar con el control, mostraron apoptosis hasta en 80%. En éstas, la tasa de muerte celular, no fue diferente, por lo que no hubo cambio en el número de células, de tal forma que se presentó el efecto de detención del ciclo celular. La cantidad de células en las líneas celulares 3T3 y Rat2 mostraron respuesta diferente. El tratamiento de estas células con PA1 (15 μ M), produjo el efecto de detención del ciclo celular en forma inicial, hasta que un incremento en la dosis (25 μ M), también indujo la muerte celular. La líneas celulares Hela, HepG2, HT29 y MCF-7, tratadas con PA1 (5 μ M), inicialmente presentaron detención en el ciclo celular y a continuación se presentó la apoptosis. No hubo diferencia en el número total de células tratadas hasta con la dosis de 10 μ M de PA1.

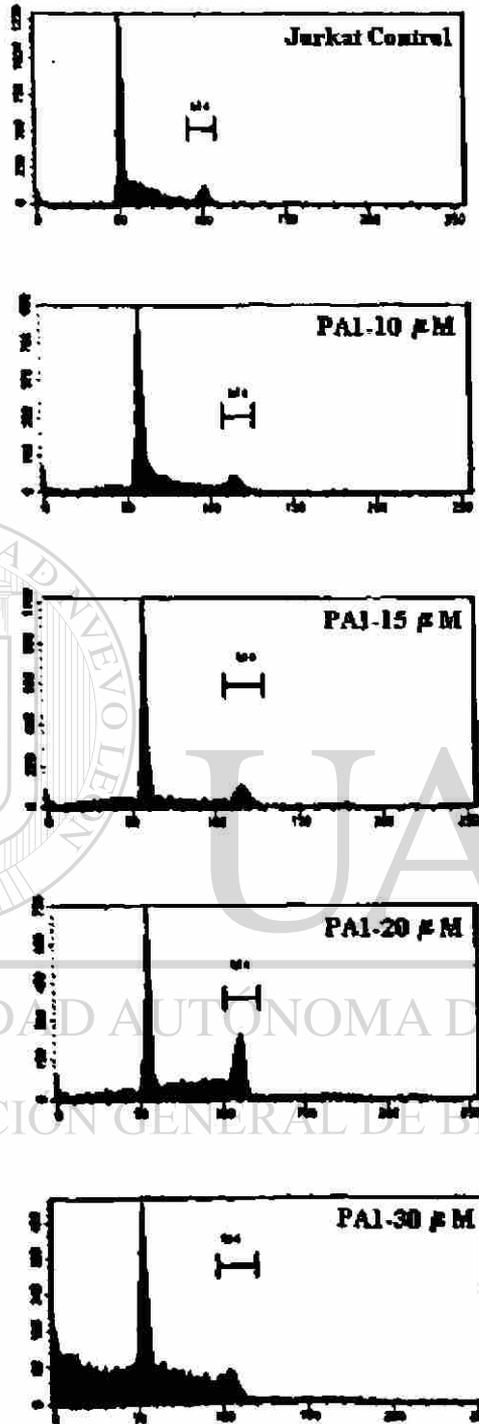


Figura 7. Detención del ciclo celular en células Jurkat control (Recuadro superior) y expuestas a PA1 (10,15,20 y 30 μ M)

La inducción de apoptosis independiente de Caspasas.

El compuesto monofluorocetona (z-VAD), es un inhibidor reversible de las enzimas ICE y CPP32¹⁹⁰ (caspasas), y previene en forma efectiva la degradación del DNA (apoptosis). En la Figura 8, se muestra la eficacia del z-VAD para prevenir la degradación del DNA producida por PA1 (30 μ M) en células Jurkat. El grado de protección con el compuesto z-VAD, para impedir alteración de la membrana citoplásmica (desarrollo de necrosis) en las células tratadas con PA1, fue inadecuado con dosis menores (1, 3, 10 μ M) y hasta 30 μ M de PA1 (Figura 9), las células dañadas presentaron muerte celular tardía por necrosis.

Citotoxicidad en células HL-60 y HL-60/MX2.

El potencial de citotoxicidad del compuesto PA1, se evaluó en el ensayo de inhibición en dos líneas celulares de leucemia humana: HL-60 y HL-60/MX2. Después de 3 días de exposición a la PA1, se encontró un efecto citotóxico marcado en las células HL-60, mientras que las células HL-60/MX2 (resistentes a mitoxantrona), presentaron una sensibilidad reducida.

El valor del índice de resistencia relativo- IRR: $[CI_{50}^{HL60/MX2}] / [CI_{50}^{HL60}]$ fue de 3. El valor de este índice, fue bajo al relacionarlo con el de los quimioterapéuticos usados en la clínica: etopósido y mitoxantrona (controles conocidos), los cuales actúan como venenos de topoisomerasa II, estimulando la degradación del DNA (Tabla 10).

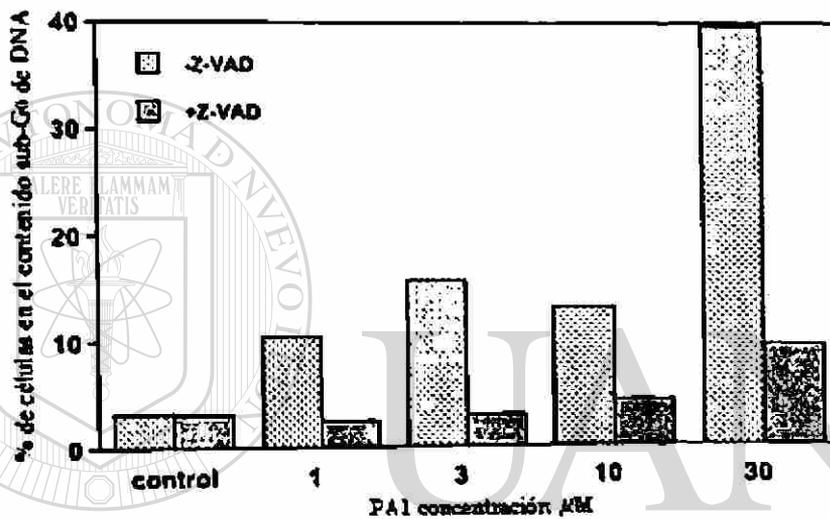


Figura 8. Prevención de la apoptosis inducida por la PA1 en células Jurkat por el z-VAD.

TABLA 10

**CITOTOXICIDAD DE LA PA1 EN CELULAS HL60 y HL60/MX2
(CI₅₀, μM)***

	HL-60	HL60/MX2	I.R.R.**
Peroxisomicina (PA1)	0.35	1.04	02.97
Etopósido	0.07	4.36	62.35
Mitoxantrona	0.04	0.29	07.25

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

*Es la concentración del compuesto que inhibe el crecimiento celular del 50%, después de incubación con los compuestos durante 72 h. Cada concentración se estudió en ensayos por triplicado y el error standard de cada punto es <10%.

**Es el índice de resistencia relativa (IRR), que indica la tasa de: $CI_{50}^{HL60/MX2}$ dividida entre la CI_{50}^{HL60} .

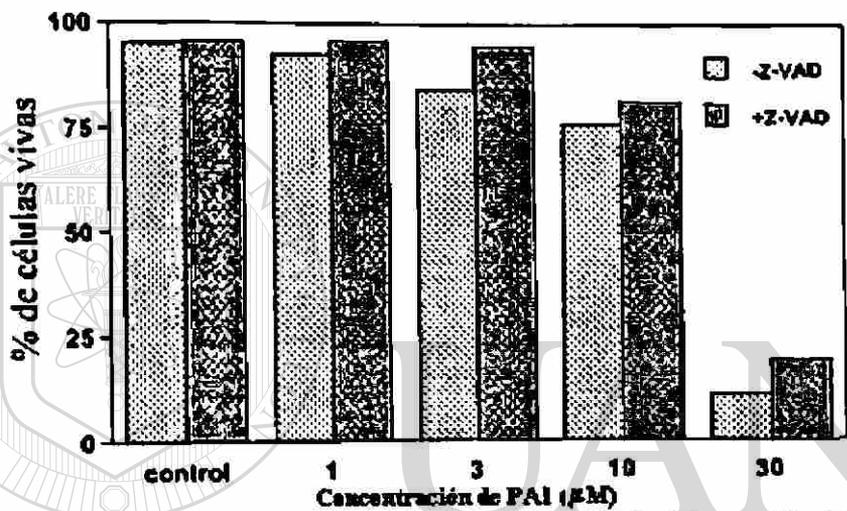


Figura 9. Inhibición general de las caspasas inducida con 30 µM de PAI en células Jurkat

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Alteraciones en el ciclo celular.

En forma paralela a la evaluación de citotoxicidad, se estudiaron las variaciones en el perfil del ciclo celular durante el tratamiento de las líneas celulares HL-60 y HL-60/MX2 con la PA1. Se apreciaron cambios significativos en el ciclo celular (Figura 10), al exponer a las células HL-60 a PA1 durante 24 h.

Las células con contenido de DNA sub-G₁ son consideradas generalmente células en apoptosis; el estudio por citometría de flujo de las células marcadas con I.P., mostró que el tratamiento con 1 μ M de T-514, fue suficiente para observar la presencia de células con contenido de DNA por debajo de G₁. El contenido del pico de DNA (hipodiploide, sub-G₁), representó cerca del 70% de la población celular con la dosis de 10 μ M de PA1. Se encontró un pico similar en la línea celular resistente HL-60/MX2, pero en este caso, el efecto del compuesto fue menor (Figura 11). La acumulación de células en la fase sub-G₁, fue progresiva a la disminución de las poblaciones de células en G₁ y en G₂, visualizadas en el histograma de CF, conforme se incrementó la dosis de PA1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Degradación de la polimerasa de poli-ADP-ribosa (PARP).

La enzima polimerasa de poli-ADP-ribosa (PARP) participa en la reparación del DNA y es un sustrato preferencial de la proteasa de cisteína, caspasa-3.¹⁹¹ Se prepararon lisados de células HL60 (las cuales fueron sensibles a la PA1) y estas fueron expuestas a la PA1 por 24 h, a continuación, se determinó la cantidad de degradación de PARP por análisis de inmunoblot. Las concentraciones de PA1 menores a 0.5 μ M indujeron ruptura cuantitativa de PARP, con longitud máxima de 116 kD a un fragmento de 89 kD (Figura 12). El efecto de PA1, fue mayor que el observado con el control positivo (etopósido); ambos compuestos se utilizaron en cantidades similares en este ensayo.

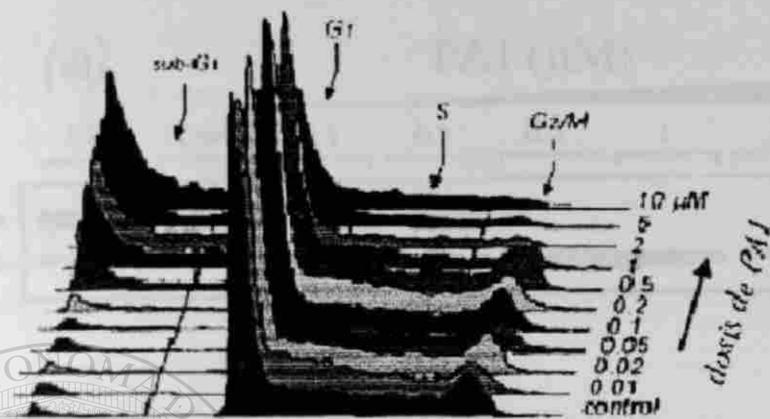


Figura 10. Efecto de la PA1 en el ciclo celular de células HL-60 (FACScan).

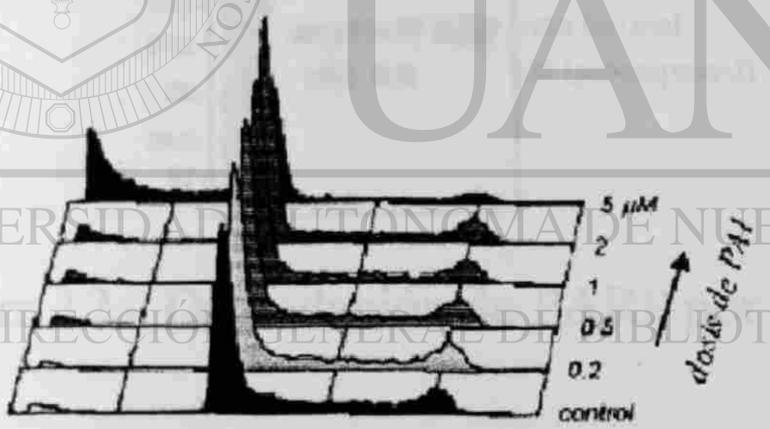
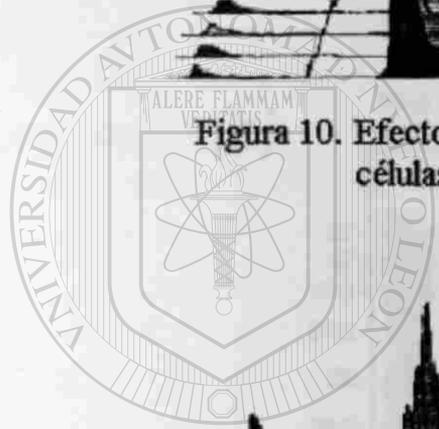


Figura 11. Efectos de la PA1 en el ciclo celular de células HL-60/MX2 (FACScan)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



degradación de la proteína PARP-1

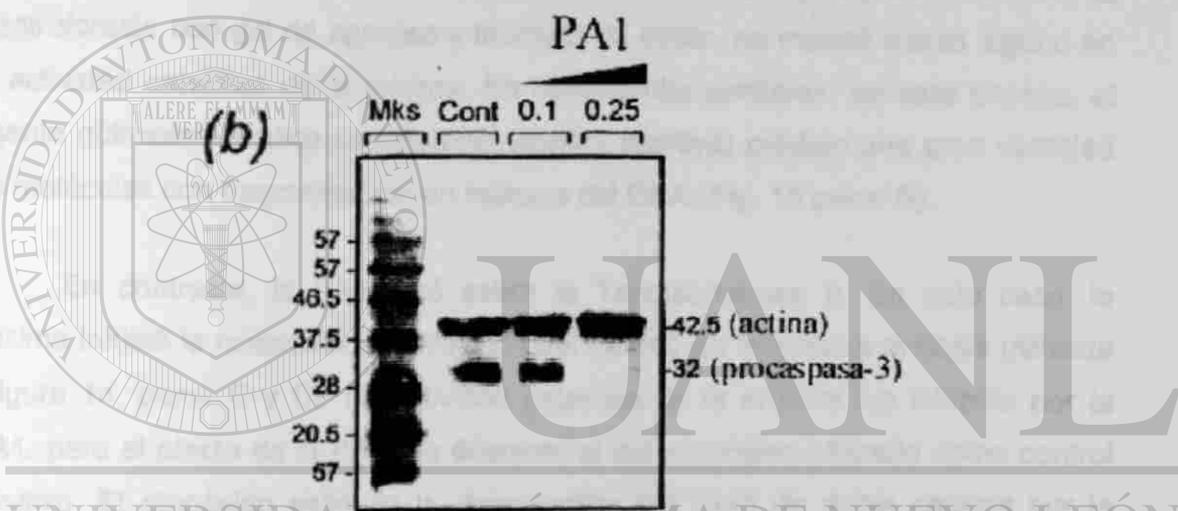
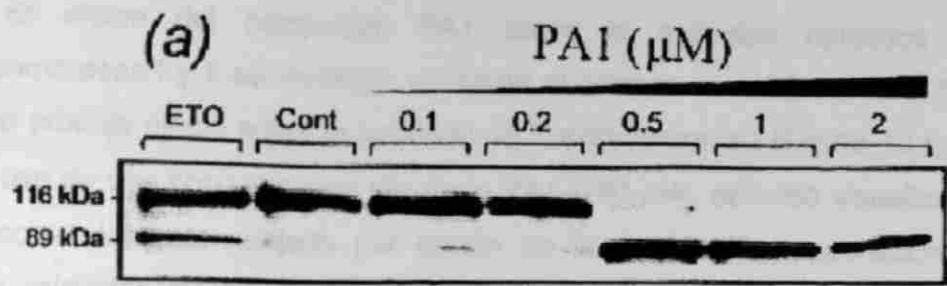


Figura 12.- Degradación de PARP por PAI

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Inhibición de la Topoisomerasa II.

El efecto del compuesto PA1 sobre la actividad catalítica de las Topoisomerasas I y II se investigó mediante el ensayo de relajación del DNA. La PA1 no produjo efecto sobre la actividad de Topoisomerasa I (Figura 13 panel A y B). El uso de una concentración alta de la PA1 (200 μM), permitió visualizar aún el DNA completamente relajado por acción de la enzima. La separación de las formas relajadas de las formas 'cortadas en muescas' (nick) del DNA, en la electroforesis con gel de agarosa y bromuro de etidio, no mostró efecto alguno en la actividad catalítica de la enzima. En condiciones similares, en este ensayo, el agente quimioterapéutico camptotecin (control positivo) produjo una gran cantidad de moléculas con fragmentación en muesca del DNA (Fig. 13 panel B).

En contraste, la PA1 actuó sobre la Topoisomerasa II. En este caso, la enzima inhibió la relajación del DNA, lo cual ocurrió en relación a la dosis utilizada (Figura 14, panel C y D). La actividad catalítica de la enzima fue inhibida por la PA1, pero el efecto de la PA1 fue diferente al del etopósido utilizado como control positivo. El etopósido estimula la degradación del DNA de doble cadena por la enzima como resultado de la estabilización de los complejos covalentes de Topoisomerasa II-DNA. Se detectó una banda correspondiente a DNA lineal por la acción del etopósido (Figura 14, panel D), lo cual no se observó con el tratamiento de la PA1, en ninguna de las concentraciones utilizadas.

Activación de Caspasas

Se obtuvo una actividad acentuada en los lisados de las células tratadas con PA1 y en baja proporción con el tratamiento de la estaurosporina (control positivo interno). No se apreció actividad en los lisados controles (sin PA1). Los ensayos fueron realizados por triplicado y las lecturas se efectuaron a 405 nm de

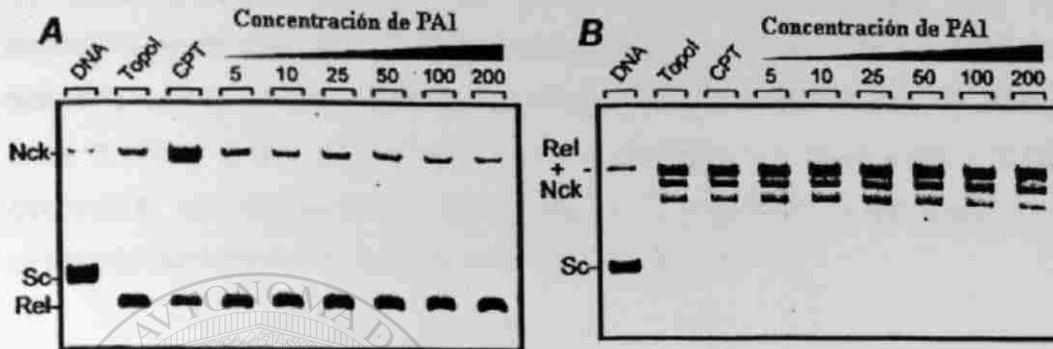


Figura 13.- Efecto de PA1 sobre Topoisomerasa I

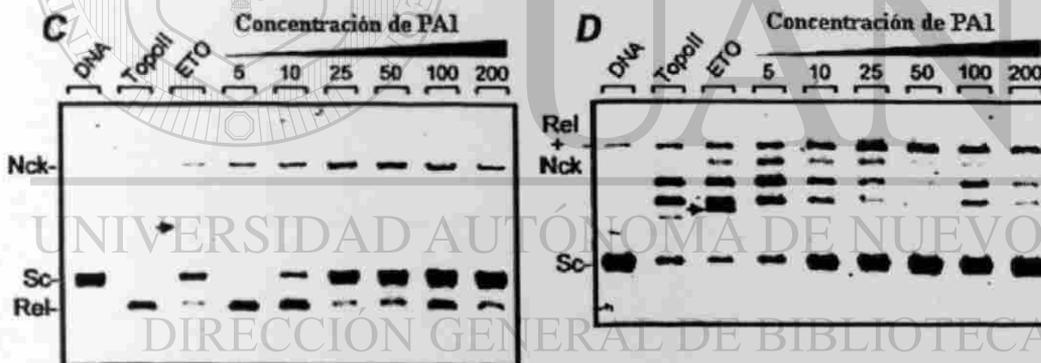
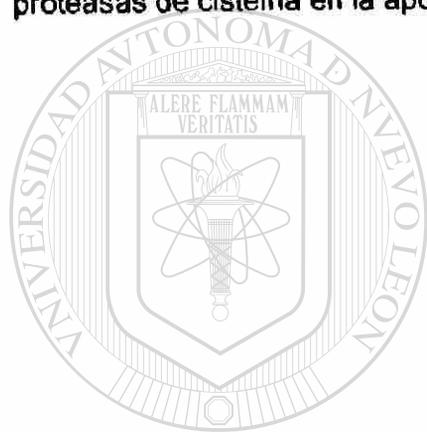


Figura 14.- Efecto de PA1 sobre Topoisomerasa II

absorbancia. La Figura 15, muestra los resultados de degradación de DEVD-pNA, substrato de caspasa-3 y la Figura 16, contiene los resultados de IETD-pNa, substrato de caspasa-8. Las mediciones son el resultado de la tasa de hidrólisis de los substratos de caspasas, en células que fueron tratadas con PA1 en concentraciones graduales. Con ambos substratos se apreció un nivel máximo de hidrólisis con la dosis de PA1 entre 0.25 μM y 0.50 μM (niveles de absorbancia entre 0.175 y 0.185 para el substrato de caspasa-3 y entre 0.15 y 0.155 para caspasa-8, respectivamente). Estos resultados muestran la participación de las proteasas de cisteína en la apoptosis inducida por PA1.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



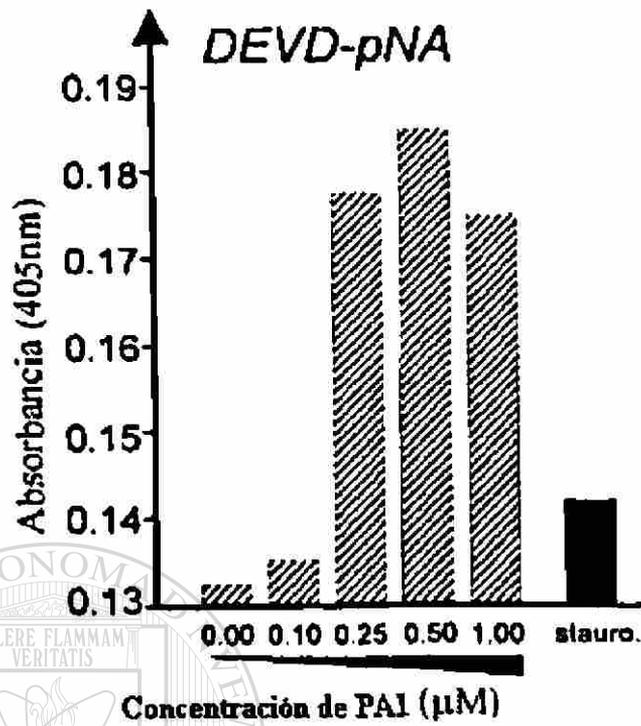


Figura 15.- Degradación de sustrato de caspasa 3 por la PAI.

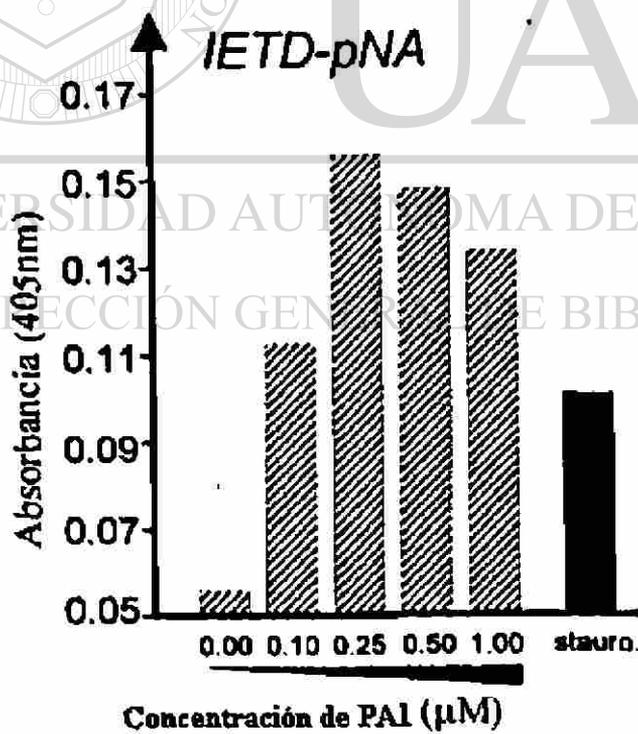


Figura 16.- Degradación de sustrato de caspasa 8 por la PAI.

CAPITULO 4

DISCUSION

Una gran variedad de agentes quimioterapéuticos pueden inducir el fenómeno de apoptosis y su sitio 'blanco' son diversos componentes intracelulares.¹⁹² La actividad citotóxica de los agentes usados en la quimioterapia del cáncer depende no únicamente de las interacciones entre el fármaco y su sitio blanco, sino también de la respuesta a la apoptosis.¹⁹³ El fenómeno biológico de apoptosis, es ampliamente aceptado como un mecanismo relevante para la respuesta clínica de los tumores a la quimioterapia. Una gran variedad de agentes quimioterapéuticos, son fármacos que dañan el DNA, los que actúan como antimicrotúbulos y a través de la apoptosis. La muerte celular por apoptosis, se entiende no sólo como el resultado simple de la activación de respuesta, sino que refleja una cantidad de interacciones complejas del fármaco con la célula: la extensión de las lesiones inducidas por el fármaco (ej. daño al DNA), el tipo de lesiones al DNA, la localización genómica del daño al DNA, la persistencia de alteraciones potencialmente reversibles (ej. estabilidad de rupturas del DNA mediadas por acción sobre las topoisomerasas) y la capacidad de la célula para reconocer y reparar las lesiones.

La expresión adecuada de los genes tales como c-myc, p53 o bcl-2, es indispensable para alcanzar la respuesta celular e iniciar así la apoptosis.¹⁹⁴ Esto concuerda con el criterio convencionalmente aceptado de la existencia de una vía de transducción eficiente para la apoptosis; lo cual es una condición necesaria, mas no suficiente para la inducción de apoptosis por la quimioterapia. Se trata de la susceptibilidad celular a la apoptosis inducida por la quimioterapia, lo cual representa una modalidad de la regulación farmacogenética.

La inducción de apoptosis en las células tumorales, es un factor crítico en la sensibilidad de las células neoplásicas; sin embargo, la inducción de la apoptosis por fármacos refiere la capacidad de la célula para activar esta respuesta por medio de las reacciones subcelulares que se suscitan entre el fármaco y la célula. Estas forman parte de la extensión de las lesiones moleculares inducidas por el fármaco, ej. el daño al DNA o su respuesta celular específica, la reparación del DNA o la apoptosis subsecuente. Esta última es estimulada por mecanismos intrínsecos de genes que detectan daño permanente potencial al DNA y pueden iniciar el proceso. La degradación del DNA, mediada por alteración en la estabilidad de las enzimas PARP y DNA topoisomerasas I y II son igualmente representativas de la respuesta celular para restaurar el daño genómico.¹²³

En el presente estudio se demostró la capacidad de la Peroxisomicina A1, para inducir apoptosis *in vitro*. Se obtuvo un efecto en relación con la dosis: hubo presencia de apoptosis en todas las líneas celulares eucariotes establecidas y en el control positivo de cardiomiocitos (cultivo primario). Este resultado se obtuvo con todas las concentraciones utilizadas y pudo ser detectado aún con las dosis menores (10 μM) (Figura 5). Para los ensayos de la integridad de las vías de transducción de la apoptosis en células de leucemia humana (HL60 y HL60/MX2), las dosis de PA1 requeridas fueron aún menores ($> 1 \mu\text{M}$), (Figuras 13 y 14).

Todas las líneas celulares seleccionadas para este estudio, se caracterizan por tener mutaciones genómicas en uno o varios genes (excepto el control), ej. el gen p53 (en células HT-29) y en conjunto los genes p53-Rb (en células HeLa y 293). La PA1, produjo alteraciones en el ciclo celular en todas las líneas celulares estudiadas e indujo el fenómeno de apoptosis.

Se ha demostrado que la pérdida de la función normal de los genes, sensibiliza a las células a la acción de los agentes quimioterapéuticos, dando como resultado un incremento en la detención del ciclo celular de las células cancerosas en la fase G2/M y como consecuencia el desarrollo de apoptosis. Los retrasos que experimentan las células en las fases G1, S ó en G2, durante el ciclo

celular, se manifiestan en una de dos formas: la primera como un retraso transitorio en la fase G1, S ó en G2, independiente de la función de la proteína p53, lo cual proporciona tiempo para la reparación del DNA, antes de continuar el ciclo celular. La segunda como un retraso, dependiente de la función del gen p53, puede iniciar la apoptosis o causar un retraso prolongado, probablemente permanente, durante la fase G1 del ciclo y las células son así eliminadas por apoptosis. Lo anterior, se ha comprobado en el caso del gen p53 y la acción del compuesto Taxol en células de cáncer de ovario que presentan ausencia de la función del gen p53 y están transfectadas con el gen para bax.¹⁹⁵ Estas células, presentaron una sensibilidad mayor a la apoptosis inducida por el Taxol, con lo cual se demostró que las vías de transducción independientes de la intervención del gen p53, determinan la sensibilidad tumoral a la acción de este compuesto. El mecanismo que participa en éste fenómeno no se ha aclarado, sin embargo, se ha sugerido que la molécula BAX pudiera hallarse involucrada en este proceso.¹⁹⁶

En el presente estudio, la apoptosis se presentó con mayor acentuación en las líneas celulares HeLa, HepG2, HT29 y MCF-7. En estas células la detención de su ciclo celular en la fase G1/S, depende del gen Rb y a la vez de las proteínas que participan en esta fase como son varias proteínas cdk y p21.¹⁹⁷ Los hallazgos de la apoptosis producida por la PA1, en el presente estudio, están en concordancia con el criterio de inhibición de Cdk mediado universalmente por la proteína p21,¹⁹⁸⁻²⁰⁰ cuya expresión genética se encuentra regulada directamente por la proteína supresora p53, la cual se incrementa en forma significativa, cuando el gen p53 es inducido posteriormente al daño en el DNA.^{201,202} De esta forma se ha establecido que la proteína p21 es el mediador de p53 durante la detención del ciclo celular.^{203,204} Este mecanismo podría participar indirectamente durante la detención del ciclo celular que se presentó por la acción del compuesto PA1 en este estudio. La inducción de la proteína p21 por p53 en las células cancerosas podría confirmarse adicionalmente. El gen p53, participa en la detención del crecimiento como activador de la transcripción. Este gen, induce la expresión de una proteína de 21 kD (Waf-1: wild-type activated fragment o Cip-1: CDK interacting protein), que inhibe los complejos de cinasas de ciclinas y así impide la

continuación del ciclo celular. También activa la transcripción de *GADD45* (growth arrest and DNA-damage response gene). Este gen se relaciona con la respuesta al daño del DNA. Los niveles de p53, aumentan por las reservas de ribonucleótidos, la hipoxia y la supresión del estímulo de citocinas. El gen p53 reduce las mutaciones oncogénicas y facilita la reparación del DNA, también promueve la apoptosis.

La CF es el método de elección para la detección y cuantificación de la apoptosis, cuando se utilizan cantidades grandes de células y distingue claramente entre células apoptóticas y no apoptóticas por medio de tinción del DNA.²⁰⁵ A la vez se utiliza ampliamente para estudiar los mecanismos de la muerte celular (apoptosis), al utilizar compuestos citotóxicos.²⁰⁶ En el presente estudio, el ensayo de CF hizo factible la identificación de diferentes estadios del ciclo celular y del fenómeno de apoptosis con gran certeza en todas las líneas celulares estudiadas, así como la discriminación precisa entre la apoptosis y la necrosis en el ensayo de citotoxicidad con la PA1.

Los estudios de CF, fueron reproducibles y mostraron la sensibilidad de las líneas celulares normales y tumorales a la PA1. Las células en apoptosis contienen DNA fragmentado y se observan en la región <2C de DNA.²⁰⁷ Este método, detectó células en apoptosis, una vez que habían perdido cierta cantidad de DNA. Lo anterior es un fenómeno terminal en la célula, con respecto a los eventos moleculares que caracterizan la apoptosis (la fragmentación del DNA en la región de unión de los nucleosomas); este proceso precede a las alteraciones de la permeabilidad de la membrana citoplásmica. Por otro lado la muerte celular por necrosis, se caracteriza por una alteración temprana en la permeabilidad de la membrana citoplásmica, con degradación subsecuente e irregular del DNA causada por las enzimas hidrolasas.

La eficacia antineoplásica de los nuevos agentes quimioterápicos en fase preclínica, para tumores con mutaciones genéticas (en particular del gen p53), se ha relacionado con la habilidad de éstos fármacos para inducir apoptosis en forma

independiente de la participación del gen p53²⁰⁸. La proteína p53 es activada y aumenta su concentración, si las células son expuestas a los agentes que dañan al DNA: luz ultravioleta, radiación gamma, agentes químicos genotóxicos. Estos cambios, detienen el ciclo celular en la fase G₁ y la célula repara el daño causado al DNA, antes de continuar hacia la fase S. Si el daño al DNA es irreparable, la actividad aumentada de p53, dirige las células hacia la apoptosis. Los eventos nucleares que se hallan presentes durante la apoptosis, requieren de la acción inicial de las proteasas de cisteína (caspasas) y esto incluye la degradación del DNA²⁰⁹. Sin embargo, los cambios que se presentan en el citoplasma, pueden ser independientes de la acción de las caspasas. Este fue el caso de las líneas celulares tratadas con el compuesto PA1, en donde se observó que los cambios pueden explicarse por la interpretación más reciente de las funciones que realizan las proteasas de cisteína²¹⁰. Se ha descrito que los eventos celulares que se presentan durante la apoptosis, como la degradación del DNA y los cambios morfológicos pueden inducirse por separado.

La expresión aumentada del gen bax y el incremento subsecuente en la producción de gangliósidos, se han asociado con la inducción de cambios apoptóticos, en los que las alteraciones en el potencial de la membrana de la mitocondria ($\Delta\psi$), puede ser el estímulo directo para la apoptosis, independiente de las caspasas.²¹¹ Este criterio, podría ser una base de explicación para la acción del compuesto PA1 y de sus efectos obtenidos en el presente estudio en las células 3T3 y Rat2: la detención inicial de su ciclo celular, seguida de la inducción de la muerte celular con el incremento en las dosis de PA1. Las líneas celulares HeLa, HepG2, HT29 y MCF-7, mostraron la detención del ciclo celular seguida de apoptosis. Igualmente en las células Jurkat (ejemplo representativo de esta acción inductora), una proporción mayor de éstas, presentó el contenido de DNA aumentado en la fase G₂/M (Figura 6), lo cual se obtuvo como resultado del tratamiento del cultivo con la dosis de 10 μ M de PA1. La cantidad de células que se detuvieron en la fase G₂/M del ciclo celular, fue el doble que en el control; este aumento fue seguido de apoptosis, con la concentración de 10 μ M de PA1 (21% y 10% respectivamente). La detención del ciclo celular en la fase G₂/M se observa

cuando la degradación del DNA es causada por la acción de sustancias que causan la abolición del punto de restricción del ciclo celular en la fase G2.²¹² Este hallazgo, se ha asociado con la acumulación de complejos relativamente reactivos de ciclina B1/Cdc2 hiperfosforilada.²¹³ Así, las células con alteración en la función del gen p53, parecen mostrar mayor sensibilidad a algunas sustancias que eliminan los puntos de restricción del ciclo celular.²¹⁴ La acción del compuesto PA1 con detención del ciclo celular de las células estudiadas, verifican lo anterior.

Los resultados obtenidos con las células HL-60 y HL-60/MX2, mostraron que la topoisomerasa II es un blanco selectivo de la PA1. En contraste con el etopósido (control positivo), la PA1, no estabiliza los complejos covalentes de topoisomerasa II-DNA,²¹⁵ sin embargo, inhibe la actividad de la enzima. La posibilidad de una unión directa a la enzima es altamente probable, debido a que la PA1 no tiene una interacción importante con el DNA; lo cual se comprobó en ausencia de topoisomerasa II. El compuesto PA1, no es un veneno de Topoisomerasa II, pero debe considerarse como un agente supresor el cual previene o hace reversible la formación de complejos Topoisomerasa II-DNA.

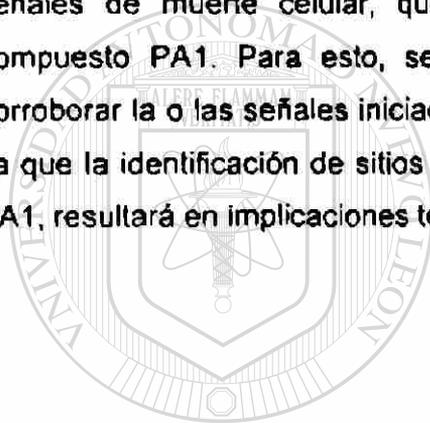
La toxicidad de la PA1, fue tres veces menor en las células HL-60/MX2 (resistentes al fármaco antitumoral mitoxantrona),²¹⁶ que en las células HL60. En forma comparativa, el control positivo (etopósido), el cual es un veneno para la topoisomerasa II, la línea celular deficiente de topoisomerasa II (HL60/MX2), es resistente 62 veces, en comparación con la línea celular HL-60 (Tabla 10). El índice de resistencia relativa (IRR), fue menor con mitoxantrona, pero aún mayor que con PA1. Los patrones de resistencia cruzada que se observaron con la PA1 son comparables a los reportados con las drogas quimioterapéuticas para el cáncer actinomicina D y doxorubicina, los cuales se consideran inhibidores débiles de la topoisomerasa II y tienen actividad menor que el fármaco etopósido.²¹⁷ Con este criterio, es razonable establecer que la inhibición de la topoisomerasa II por acción de la PA1, juega un papel central, aunque menor, en la citotoxicidad producida por este compuesto. La actividad catalítica de la topoisomerasa II está alterada en la línea celular HL-60/MX2, a la par que los niveles de topoisomerasa

II α y II β .^{216,218} Las evaluaciones de citotoxicidad, y los resultados experimentales a nivel molecular, indican que la PA1, afecta en forma directa la actividad funcional de la topoisomerasa II. Sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto, es muy probablemente múltiple.

Las células HL-60 de leucemia humana, pueden entrar rápidamente a apoptosis, debido esencialmente a que carecen del gen p53. Las alteraciones en el contenido de DNA pueden ser el resultado de la degradación del DNA celular por activación de nucleasas endógenas durante la apoptosis. Esta observación y los hallazgos en las líneas celulares estudiadas, llevaron a realizar los ensayos para conocer si se presentaba la degradación de PARP (polimerasa de ADP-ribosa) e inhibición a la par de la Topoisomerasa II. Los ensayos para PARP, indicaron claramente que el tratamiento de las células HL-60 con el compuesto PA1 estimula la degradación proteolítica de la polimerasa de ADP-ribosa y sugieren a la vez que el efector (caspasa-3),¹⁹¹ se encuentra involucrado en la activación de la apoptosis producida por PA1. Una vez activadas las caspasas, se presentan los cambios de la apoptosis y el proceso ya no se detiene. La proteína APAF-1, tiene capacidad para unirse y activar la caspasa-3 y así iniciar la cascada de caspasas. Esta caspasa, puede a su vez unirse al ATP y de esta forma se decide si la célula morirá por apoptosis o por necrosis. La caspasa-3, también se une a Bcl-2 la cual secuestra Apaf-1 de la caspasa-3 y suprime la apoptosis. Sin embargo, la familia de genes Bcl-2 funciona 'río arriba' en las caspasas: una vez iniciada la cascada, Bcl-2 (proteína con función antiapoptótica), no puede impedir la apoptosis. El potencial de membrana en la pared de la mitocondria es una señal 'temprana' para realizar la apoptosis. Su alteración propicia que el contenido de la mitocondria (el citocromo c), salga al citoplasma y así iniciar la activación de las caspasas.

El estudio del ciclo celular y las mediciones de degradación de PARP confirmaron por citometría de flujo y análisis de Western blot respectivamente, que el compuesto PA1, induce apoptosis en las células HL-60; a la vez, las proteasas de cisteína 3 y 8, se hallan activadas por PA1 (Figuras 16 y 17). Los estudios

realizados con agentes genotóxicos y con inhibidores de topoisomerasa, han mostrado la presencia de apoptosis asociada a la activación de caspasas.²¹⁹ La caspasa-3, se considera esencial en la propagación de la señal de apoptosis por varios compuestos antitumorales.²²⁰ La caspasa-3, se encuentra involucrada en la apoptosis inducida por etopósido en células HL-60.²²¹ Esta enzima, juega igualmente, un papel central en la activación de la apoptosis inducida por el compuesto PA1. La inhibición de topoisomerasa II puede servir como una señal inductora que inicia el estímulo para la muerte celular, pero no se descartan otras señales de muerte celular, que podrían estar involucradas en la acción del compuesto PA1. Para esto, sería conveniente la realización del estudio para corroborar la o las señales iniciadoras en la activación del proceso de la apoptosis. ya que la identificación de sitios blanco específicos en células neoplásicas para la PA1, resultará en implicaciones terapéuticas potenciales para este compuesto.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1.- La acción de la Peroxisomicina A1 (PA1), se presentó por medio del fenómeno biológico de la Apoptosis, tanto en las células normales como en las células tumorales estudiadas.

2.- La acción del compuesto PA1, mediada por la Apoptosis, en el panel de estudio de 10 líneas celulares, fue más importante en las células tumorales de estirpe hematológica y epitelial.

3.- La Apoptosis causada por PA1 en las células de leucemia humana HL60 y HL60/MX2, fue altamente significativa a dosis mínimas (1 μ M) y estas líneas celulares mostraron muy alta sensibilidad al compuesto.

4.- En células HL60 y HL60/MX2, se encontró que los sitios 'blanco' para la PA1, fueron: la enzima Topoisomerasa II, la enzima polimerasa de la ADP-ribosa (PARP) y las enzimas transductoras de la señal de apoptosis: caspasa 3 y 8.

Se acepta la hipótesis de trabajo planteada para el presente estudio:

"La acción del compuesto Peroxisomicina A1 (PA1) en células eucariotes *in vitro*, es mediada a través del fenómeno de Apoptosis".

REFERENCIAS

- 1.- Houghton, J.A. (1999). Apoptosis and drug response. *Curr. Opin. Oncol.* 11, 475-481.
- 2.- Chabner, B.A., y Myers C.E. (1989). *Clinical Pharmacology on Cancer Chemotherapy*. En: De Vita, V.T.J., Hellman, S., Rosenberg, S.A. Editores). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. J.B. Lippincott. Philadelphia. pp 349-395.
- 3.- Chin, K.V., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1993). Function and regulation of the human multidrug resistant gene. *Adv. Cancer Res.* 60, 157-180.
- 4.- Dive, C., Hickman, J.A. (1991). Drug-target interactions: Only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer* 64, 192-196.
- 5.- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994). Apoptosis-Its Significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-26.
- 6.- Hickman, J.A., Gumby, R.H., Brunat, C., Brady, G., Pritchard, D.M. y Potten, C.S. (1998). Induction of Apoptosis by Anticancer Drugs. En: *Pharmaceutical Intervention of Apoptotic Pathways*. Nagel Karke, J.F., Van Dierendonck, J. H y Noteborn, M.H.M. (Editores). Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. North Holland. Amsterdam.
- 7.- Kaufmann, S.H. (Editor), (1997). Apoptosis. Pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology Vol.41*, Academic Press. San Diego.
- 8.- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- 9.- Tomei, L.D., Cope, F.O., Barr, P.J. (1994). Apoptosis: Aging and Phenotypic Fidelity. En: *Current communications in Cell and Molecular Biology. Apoptosis II. The Molecular Basis of Apoptosis in Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. pp 377-396.
- 10.- Kuehlewein, H (1902). En: *Hippocratis opera quae feruntur omnia*. 35, 376-378 (Leipzig: Tubner Ed.) Vol.2, pp.265.
- 11.- Esposti, M. D. (1998). Apoptosis: who was first? *Cell Death Differ.* 5, 719.
- 12.- Hetts, S.W. (1998). To die or not to die. *J.A.M.A.* 279, 300-307.
- 13.- Vogt, C. (1842). *Untersuchungen (berdie Entwicklungs. Geschinchte der Geburstshelferkroete Alytes obstetrician Jent und Gassmann, Solothurn.*

- 14.- Wyllie, A.H. (1987). Apoptosis: cell death and tissue regulation. *J. Pathol.* 153, 313-316.
- 15.- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, 663-698.
- 16.- Golstein, P., Ojcius, D.M., Young, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121, 29-65.
- 17.- Heintz, N. (1993). Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends. Biochem. Sci.* 18, 157-159.
- 18.- Boobis, A.R., Fawthrop, D.J., Davies, D.S. (1990). Mechanisms of cell toxicity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 231-237.
- 19.- Bansal, N., Houle, A., Melnykovich G. (1991). Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB J.* 5, 211-216.
- 20.- Harmon, B.V., Takano, T.S., Winterford, C.M., et al. (1991). The role of apoptosis in the response of cells and tumors to mild hyperthermia. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 489-501.
- 21.- Wartens, R.L. (1992). Radiation-induced apoptosis in murine T-cell hybridoma. *Cancer. Res.* 52, 883-890.

- 22.- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.G., et al. (1990). Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumor and normal cells. *Anticancer Res.* 10, 1153-1159.
- 23.- Hickman, J. A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 121-139.
- 24.- Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80, 879-886.
- 25.- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- 26.- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J. Pathol* 146, 3-15.
- 27.- Cummings, M.C. Winterford, C.M., Walker, N.I. (1997). Apoptosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 21, 88-101.
- 28.- Tomei, L.D., Cope, F.O. (1991). *The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- 29.- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gene Dev.* 10, 1-15.
- 30.- Yang, E., Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401
- 31.- Leist, M., Nicotera, P. (1997). The shape of cell death (breakthroughs and views). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 1-9.
- 32.- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 186, 25-37.
- 33.- Tang, D.G., Porter, A.T. (1996). Apoptosis: a current molecular analysis. *Pathol. Oncol. Res.* 2, 117-130.
- 34.- Hoffman, B., Liebermann, D.A. (1994). Molecular controls of apoptosis: differentiation / growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene.* 9, 1807-1812.
- 35.- Preston, G.A., Lyon, T.T., Yin, Y, et.al. (1996). Induction of apoptosis by the c- Fos protein. *Mol.Cell Biol.* 16, 211-218.
- 36.- Evan, G., Wyllie, A. H., Gilbert, C., et.al. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- 37.- King, K.L., Cidloski, J.A.. (1995). Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell. Biochem.* 58, 175-180.
- 38.- Evan, G.I., Harrington, E., McCarthy, N., Gilbert, C., Benedict, M.A., Nunez, G. (1996). Integrated control of cell proliferation and apoptosis by oncogenes. En: Thomas, N.S.B. (editor). *Apoptosis and Cell Cycle Control in Cancer*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd. pp. 109-129
- 39.- Wyllie, A. H., Kerr, J.F.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
- 40.- Umansky, S.R. (1982). The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J. Theor. Biol.* 87, 591-602.
- 41.- Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 356, 397-400.

- 42.- Thompson, E.B. Special Topic: Apoptosis (1998). *Annu. Rev. Physiol.* 60, 525-532.
- 43.- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- 44.- Wyllie, A.H. (1993). Apoptosis. *Br. J. Cancer* 67, 205-306.
- 45.- Hoffman, B., Liebermann, D.A. (1994). Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* 9, 1807-1812.
- 46.- Fesus, L., Davies, P.J., Piacentini, M. (1991). Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell. Biol.* 56, 170-177.
- 47.- Schwartzmann, R.A., Cidlowski, J.A. (1993). Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinol.* 133, 591-599.
- 48.- Kerr, J.F.R., Harmon, B.V. (1994). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. En: Tomei, L.D., Cope, F.O. (editores). *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y.
- 49.- Ueda, N., Shah, S.V. (1994). Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.* 124, 169-177.
- 50.- Arends, M.J., Wyllie, A.H. (1991). Apoptosis. Mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254.
- 51.- Bortner, C. D., Oldenburg, N.B.S., Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21-8.
- 52.- Knight, C.R., Rees, R.C., Griffin, M. (1991). Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumor progression. *Biochem. Biophys. Acta.* 1096, 312-18.
- 53.- Golstein, P. (1997). Controlling cell death. *Science* 275, 1081-82.
- 54.- Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *T.I.B.S.* 22, 299-306.
- 55.- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.
- 56.- Hengartner, M.O. y Horovitz, H.R. (1994). The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 345, 243-256.

- 57.- Hengartner, M.O. y Horovitz, H. R. (1994). Activation of *C elegans* cell death protein CED-9 by an amino acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature*, 369, 318-320.
- 58.- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X. et.al.(1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
- 59.- Chinnayan, A.M., Chaudhary, D., O'Rourke, K. et.al. (1997). Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388, 728-729.
- 60.- Hengartner, M O. y Horovitz, H.R. (1994). *C elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogen *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.
- 61.- Clem, R.J., Fechheimer, M. y Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
- 62.- Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.
- 63.- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. y Croce, C. (1985). Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 14140-1443.
- 64.- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S. et.al. (1994). Interactions among members of the *bcl-2* protein family analysed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 9238-9242.
- 65.- Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I. et.al. (1995). Cloning of a *bcl-2* homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.
- 66.- Kiefer, M. C., Brauer, M.J., Powers, V.C. et al. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739.
- 67.- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., et. al. (1995). Cloning and functional analysis of Bag-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-284.
- 68.- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. y Dixit, V.. (1997). Interaction of CED-4 and CED-9: a molecular framework for cell Death. *Science* 275, 1122-1126.
- 69.- Schendel, S.L., Montal, M. y Reed, J. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death and Diff.* 5, 372-380.

- 70.- Ichas, F., Jouaville, S. y Mazat, J.P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 1145-1153.
- 71.- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., y Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome-c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- 72.- Evan, G.I. y Littlewood, T.D. (1993). The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 44-49.
- 73.- Harrington, E.A., Fanidi, A., y Evan, G.I. (1994). Oncogenes and cell death. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 120-129.
- 74.- Lowe, S.W. (1996). The role of p53 in apoptosis, en: *Apoptosis in Normal Development and Cancer* (Editor M. Slysler). Taylor & Francis. London. pp. 97-125.
- 75.- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- 76.- Vaux, D.L., Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239-2244.
- 77.- Alnmeri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W. et. al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87,171.
- 78.- Clark, W.H. (1991). Tumor progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer* 64:631-644.
- 79.- Ryser, H.J. (1971). Chemical carcinogenesis. *N. Engl. J. Med.* 285, 721-734.
- 80.- Reichmann, A., Martin, P., Levin, B. (1981). Chromosome banding patterns in human large bowel cancer. *Int. J. Cancer* 28, 431.
- 81.- Cory, S., Strasser, A., Jacks, T., Corcoran, L.M., Metz, T., Harris, A.W., Adams, J.M. (1994). Enhanced cell survival and tumorigenesis. En: *The Molecular Genetics of Cancer. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. LIV.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. pp 365-375.
- 82.- Harrington, E.A., Fanidi, A., Evan, G.I. (1994). Oncogenes and cell death. *Curr. Opin. Genetics Development.* 4, 120-129.
- 83.- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100,57-70.

- 84 - Hartwell, L.H., Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821.
- 85.- Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 80, 879-886.
- 86.- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenberry, D., Kanagawa, O., Korsmeyer, S.J. (1991). Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection of thymocytes. *Cell* 67, 879.
- 87.- Reed, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124,1.
- 88.- Fernández-Sarabia, M.J., Bischoff, J.R. (1993). Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 366, 274-275.
- 89.- Laucat, F.R., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A.G., Debatin, K.M., Fischer, A., De Villartay, J.P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- 90.- O'Connell, J., Sullivan, G.C., Collins, L.J., Shanahan, F. (1996). The fas counterattack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J.Exp. Med.* 184, 1075-1082.
- 91.- Fisher, D.E. (1994). Apoptosis and cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78, 539-542.
- 92.- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- 93.- Staunton, M.J., Gaffney, E.F. (1995). Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 103, 300-307.
- 94 - Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Van Dyke, T. (1997). Bax, suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385, 637-640.
- 95.- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., et.al. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-969.
- 96.- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., et.al. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.

- 97.- Levine, E.L., Renehan, A., Gossiel, R. et al. (1995). Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother. Oncol.* 37, 1-9.
- 98.- Ellis, P.A. Smith, I.E., McCarthy, K., Detre, S., Salter, J., Dowsett, M. (1997). Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 349, 849.
- 99.- Kaufmann, S. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note. *Cancer Res.* 49, 5870.
- 100.- Walker, P.R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J.F., Shirotska, M. (1991). Topoisomerase II-reactive Chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 51,1078.
- 101.- Shinomiya, N., Shinomiya, M., Wakiyama, H., Katsura, Y., Rokutanda, M. (1994). Enhancement of CDDP cytotoxicity by caffeine is characterized by apoptotic cell death. *Exp. Cell. Res.* 210, 236.
- 102.- Havrilesky, L.J., Elbendary, A., Hurteau, J.A., Whitaker, R.S., Rodriguez, G.C., Berchuk, A. (1995). Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Obstet. Gynecol* 85, 1007.
- 103.- Huschtcha, L.I., Bartier, W.A., Ross, C.E.A., Tattersall, M.H.N. (1996). Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs *in vitro*. *Br. J. Cancer* 73, 54.
- 104.- Tomei, L.D., Kanter, P., Werner, C.E. (1988). Inhibition of radiation-induced apoptosis *in vitro* by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155,324.
- 105.- Yao, K-S., Clayton, M., O'Dwyer, P.J. (1995). Apoptosis in human adenocarcinoma HT29 cells induced by exposure to hypoxia. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 117.
- 106.- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., Kolensik, R.N. (1994). Ionizing radiation acts on cell membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 180,525.
- 107.- Harmon, B.V., Takano, Y.S., Winterford, C.M., Bove, G.C. (1991). The role of apoptosis in the response of cells and tumors to mild hyperthermia. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 489.
- 108.- Kyprianou, N., English, H.F., Davidson, N.E., Isaacs, J.T. (1991). Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.* 51, 162.

- 109.- Redding, T.W., Schally, A.V., Radulovic, S., Milovanovic, S., Szepeshazi, K., Isaacs, T. (1992). Sustained release formulations of luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 inhibit proliferation and enhance apoptotic cell death of human prostate carcinoma (PC-82) in male nude mice. *Cancer Res.* 52, 2358.
- 110.- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994). Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013.
- 111.- Reed, J.C. (1995). Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9,451.
- 112.- D'Amico, A.V., McKenna, W.G. (1994). Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiother. Oncol* 33,3.
- 113.- Sen, S., D'Incalci, M (1992). Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett* 307,122.
- 114.- Dive, C., Evans, C.A., Whetton, A.D. (1992). Induction of apoptosis-new targets for cancer chemotherapy. *Cancer Biol.* 3, 417.
- 115.- Su, I-J., Cheng, A-L, Tsai, T-F., Lay, J-D. (1993). Retinoic-acid induced apoptosis and regression of a refractory Epstein-Barr virus-containing T cell lymphoma expressing multidrug-resistance phenotypes. *Br. J. Haematol.* 85, 826.
-
- 116.- Moreira, L.F., Naomoto, Y., Hamada, M., Kamikawa, Y., Orita, K.(1995). Assessment of apoptosis in oesophageal carcinoma preoperatively treated by chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res.* 15, 639.
- 117.- Meyn, R.E., Stephens, L.C., Hunter, N.R., Milas, L. (1995). Apoptosis in murine tumors treated with chemotherapy. *Anticancer Drugs* 6, 443.
- 118.- Meyn, R.E., Stephens, L.C., Hunter, N.R., Milas, L. (1994). Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 33, 410.
- 119.- Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M.R., Darzynkiewicz, Z. (1993). Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 7, 659.
- 120.- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davison, N.E., Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976.

- 121.- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346.
- 122.- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269, 3071.
- 123.- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirer, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1995). Yama/CPP32b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81,1.
- 124.- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., Miller, D.K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37.
- 125.- Huschtscha, L.I., Bartier, W.A., Malmstrom, A., Tattersall, M.H.N. (1995). Cell death by apoptosis following anticancer drug treatment *in vitro*. *Int. J. Oncol* 6, 585-593.
- 126.- Miyashita, T., Reed, J.C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81, 151.
- 127.- Kamesaki, S., Kamesaki, H., Jorgensen, T.J., Tanizawa, A., Pommier, Y., Cossman, J. (1993). Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res.* 53, 4251.
- 128.- Fairgairn, L.J., Cowling, G.J., Dexter, T.M., Rafferty, J.A., Margison, G.P., Reipert, B. (1994). bcl-2 delay on alkylating agent-induced apoptotic death in a murine hemopoietic stem cell line. *Mol. Carcinogen* 11, 49.
- 129.- Lotem, J., Sachs, L. (1994). Control of sensitivity to induction of apoptosis in myeloid leukemic cells by differentiation and bcl-2 dependent and independent pathways. *Cell Growth Diff.* 5, 321.
- 130.- Kondo, S., Yin, D., Takeuchi, J., Morimura, T., Oda, Y., Kikuchi, H. (1994). Bcl-2 gene enables rescue from *in vitro* myelosuppression (bone marrow cell death) induced by chemotherapy. *Br. J. Cancer* 70, 421.
- 131.- Keith, F.J., Bradbury, D.A., Zhu, Y.M., Russell, N.H. (1995). Inhibition of bcl-2 with antisense oligonucleotides induces apoptosis and increases the sensitivity of AML blasts to Ara-C. *Leukemia* 9, 131.

- 132.- Weller, M., Mallpiero, U., Aguzzi, A., Reed, J.C., Fontana, A. (1995). Proto-oncogene bcl-2, gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J. Clin. Invest.* 95, 2633.
- 133.- Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V-M, Niskanen, E., Nordling, S., Reed, J.C. (1995). Reduced expression of Pro-apoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55, 4471.
- 134.- Strum, J.C., Small, G.W., Pauig, S.B., Daniel, L.W. (1994). 1- β -D-arabino-furanosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J. Biol. Chem* 269, 15493.
- 135.- Zhang, J., Alter, N., Reed, J.C., Borner, C., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5325.
- 136.- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scoto, K., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals *Cell*, 82, 405.
- 137.- Jaffr zou, J-P, Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rouse, A., Laurent, G (1996) Daunorubicin induced apoptosis: Triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.* 15:2417.
- 138.- Santana, P., Peña, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., MaLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman E.H., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1996): Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86:189.
- 139.- Lotem, J., Sachs, L (1992): Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemia cells. *Blood* 80: 1750.
- 140.- Fan, S., Smith, M.L., Rivet, D.J. II, Duba, D., Zhan, Q., Kohn, K.W., Fornace, A.J., Jr, O'Connor, P.M. (1995): Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res.* 55:1649.
- 141.- Eliopoulos, A.G., Derr, D.J., Herod, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J.C., Young, L.S. (1995): The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: Influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* 11:1217.

- 142.- Fuchs, E.J., Bedi, A., Jones, R.J., Hess, A.D. (1995): Cytotoxic T cells overcome BCR-ABL-mediated resistance to apoptosis. *Cancer Res.* 55:463.
- 143.- Cleary, M.L., Smith, S.D., Sklar, J (1986): Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47:19.
- 144.- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., Rickinson, A. (1993): Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8479.
- 145.- Tarodi, B., Subramanian, T., Chinnadurai, G. (1994): Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects against cell death by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. *Virology* 201: 404.
- 146.- Dole, M.G., Jasty, R., Cooper, M.J., Thompson, C.B., Nunez, G., Castle, V.P. (1995): Bcl-x_L is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55: 2576.
- 147.- Sumantran, V.N., Ealovega, M.W., Nuñez, G., Clarke, M. F., Wicha, M.S. (1995). Overexpression of Bcl-x, sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis. *Cancer Res.* 55:2507.
- 148.- Minn, A.J., Rudin, C.M., Boise, L.H., Thompson, C.B. (1995). Expression of Bclx_L can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86: 1903.
- 149.- Nooter, K., Boersma, A.V.M. Oostrum, R.G., Burger, H., Jochemsen, A.G., Stoter, G. (1995). Constitutive expression of the c-H-ras oncogene inhibits doxorubicin-induced apoptosis and promotes cell survival in a rhabdomyosarcoma cell line *Br. J. Cancer* 71:556.
- 150.- Kondo, S., Barnett, G.H., Hara, H., Morimura, T., Takeuchi, J.: (1995). MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 10:2001.
- 151.- Vargas-Zapata, R., Torres-González V., Sepúlveda-Saavedra, J., Piñeyro-López, A., Reching, K.B., Keizer-Gunnink, I., Kiel, J.A.K.W., Veenhuis, M. (1999). Peroxisomicine A₁ (plant toxin-514) affects normal peroxisome assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Toxicon* 37:385-398.
- 152.- Fernández Nava, R. (1989). El género *Karwinskia* Zucc. (*Rhamnaceae*). En: Tesis de M. en C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México., D.F. 89p.

- 153.- Clavijero, F.X. (1982). Plantas Nocivas y Extravagantes. En: Manuel León Portilla (Editor) Historia de la Antigua o Baja California, Editorial Porrúa 3ª edición., pp 31-33.
- 154.- Castillo Nájera, F. (1920). Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. En: F.Castillo-Nájera , Memorias del V Congreso Médico Mexicano. Dirección de Talleres Gráficos 1, pp. 240-244
- 155.- Padrón-Puyou, F. (1951). Estudio clínico experimental por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Med. Mex. 81:299-311.
- 156.- Del Pozo, E. (1965). Los efectos paralizantes de la Tullidora. Estudios clínicos y experimentales. Gac Med. Mex.95:179-182.
- 157.- Escobar, A., y Nieto, D. (1965). Aspectos Neuropatológicos de la Intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio Experimental. Gac. Med. Mex. 95: 163-177.
- 158.- Puértolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F., y Oyervides, J. (1984). Poliradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Med. I.M.S.S. (México). 22: 25-31.
- 159.- Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W.R., Smith, R., Daves, G.D. (1975). Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Amer. Chem Soc. 97: 4895-4990.
- 160.- Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N. (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. Planta Medica 56:562.
- 161.- Weller, R.O., Mitchell, J., and Daves Jr., G.D. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) Toxins. Chapter 23. En: Peter S.Spencer and Herbert H. Schaumburg (Eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, Williams & Wilkins. Baltimore/London. 1980. pp 336-347.
- 162.- Guerrero, M., Piñeyro, A., and Waksman, N. (1987).Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana*. (Tullidora). Toxicon 25: 565-568.
- 163.- Salazar, M.L., Piñeyro, A., Waksman, N. (1996). A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. J. Liq.Chrom. & Rel. Technol. 19: 1391-1403.
- 164.- Bermúdez, M.V., González-Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1986). Experimental Intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). Toxicon 24: 1091-1097.

- 165.- Bermúdez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. & Piñeyro, A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicol* 30: 1493.
- 166.- Martínez, F.J., Ramírez, R., Waksman-de Torres, N., and Piñeyro-López A. (1997). Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast T-514 (peroxisomicine A2). *Toxicol. Lett.* 90: 155-162.
- 167.- Garza-Ocañas L., Hsieh, G.C., Acosta, D., Torres-Alanís, O. and Piñeyro-López, A. (1992). Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology* 73:191-201.
- 168.- Garza-Ocañas, L., Jiang, T., Acosta, D., Torres-Alanís, O., and Piñeyro-López A. (1994). Comparison of hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in Primary liver cell cultures. *Toxicol* 32: 1287-1291.
- 169.- Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Esquivel-Escobedo, D., Waksman-de T. N. And Piñeyro-López A. (1995). Effect of Peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Médica* 61. 297-392.
- 170.- Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Ballesteros-Elizondo, R., Piñeyro-López A. and Sepúlveda-Saavedra, J. (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol* 35: 777-783.
-
- 171.- Bermúdez de Rocha, M.V., Lozano Meléndez, F.E., Tamez Rodríguez, V.A., Díaz-Cuello, G. Piñeyro López A. (1995). Frecuencia de intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. *Salud Pública Méx.* 37: 57-62.
- 172.- Bermúdez de Rocha, M.V., Lozano Meléndez F.E., Salazar Leal, M.E., Waksman N, Piñeyro López, A. (1995). Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). *Gac Méd Méx* 131: 100-106.
- 173.- Piñeyro, L.A., (1990). Toxicidad selectiva in vitro de la toxina T-514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL. Monterrey, N.L. México.
- 174.- Piñeyro-López A., Martínez-de Villarreal, L., and González-Alanís, R. (1994). In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *k. humboldtiana* (Buckthorn) plant of various human tumor cell lines. *Toxicology* 92:217-227.
- 175.- Velazco, M.R., Montero, R., Rojas, E., Gonzebatt, M.E., Sordo, M., Piñeyro, A., Ostrosky-Wegman, P. (1996). Genotoxic effects of *Karwinskia humboldtiana* toxin T-514 in peripheral blood lymphocytes. *Anti-cancer Drugs.* 7:1-5.

- 176.- Guerrero-Olazarán, M., Viader-Salvadó, J.M.(1996). Natural anthracenone subcellular distribution and effects on NADPH-cytochrome P450 reductase microsomal activity. *Drug and Chemical Toxicology* 19:301-312.
- 177.- Smets, L.A. (1994). Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* 5:3-9.
- 178.- Haq, R., and Zanke, B. (1998). Inhibition of apoptotic signaling pathways in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance. *Cancer and Metast. Rev.* 17:233-239.
- 179.- Garfield, E., Melino, G. (1997). The growth of the cell death field: an analysis of the ISI-Science citation index. *Cell Death Diff.* 4:352-361.
- 180.- Heemels, M-T (2000). Apoptosis. *Nature* 407:769-816.
- 181.- Kamesaki, H. (1998). Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int. J. Hematol.* 68:29-43.
- 182.- Dixon, S.C., Soriano, B.J., Lush, R.M., Borner, M.M., and Figg, W.D. (1997). Apoptosis: its role in the development of malignancies and its potential as a Novel therapeutic target. *Ann. Pharmacother.* 31:76-82.
- 183.- Staunton, M.J., Gaffney, E.F. (1995). Tumor type as a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 103:300-307.
- 184.- Ellis, P.A., Smith, I.E., McCarthy, K., Detre, S., Salter, J., Dowsett, M. (1995). Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 349:849.
- 185.- Meikrantz, W., Schlegel, R. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.* 58:160-174.
- 186.- American Type Culture Collection. ATCC. 2001.
<http://www.atcc.org/>
- 187.- Simpson, P. (1985). Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α 1- adrenergic receptor and induction of beating through an α 1- and β 1- adrenergic receptor interaction evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ. Res.* 56:884-94.
- 188.- Ormerod, M.G., Sun, X.M., Brown, D., Snowden, R.T., and Cohen, G.M. (1993). Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry. *Acta Oncologica* 32:417-424.

- 189.- Walker, P.R., and Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 75:287-299.
- 190.- Slee, E.A., Zhu, H.J., Chow, S.C., MacFarlane, M., Nicholson, D.W., Cohen, G.M. (1996). Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) Fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) Inhibits Apoptosis by Blocking the Processing of CPP-32. *Biochem. J.* 315:21-24.
- 191.- Favrot, M., Coll, J-L., Luo, N., and Negoescu, A. (1998). Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy.
- 192.- Hickman, J.A., and Dive, C.(1999). Apoptosis and Cancer Chemotherapy. Humana Press. Totowa, N.J.
- 193.- Guchelaar, H.J., Vermes, A., Vermes, I., Haanen, C. (1997). Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm. World Sci.* 19:119-25.
- 194.- Sancar, A. (1995). DNA repair in humans. *Annu. Rev. Genetics.* 29:69-105.
- 195.- Jones, N.A., Turner, J., McIlwrath, A.J., Brown, R. and Dive, C. (1998). Cisplatin- and Paclitaxel-Induced Apoptosis of Ovarian Carcinoma cells and the Relationship between Bax and Bak Up-Regulation and the Functional Status of p53. *Mol. Pharmacol.* 53:819-826.
-
- 196.- Strobel, T., Swanson, L., Korsmeyer, S., and Cannistra, S.A. (1996). BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 93:14094-14099.
- 197.- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K. (1995). Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by p21. *Mol. Biol. of the Cell* 6:387-400.
- 198.- Gy, Y., Turek, C.W., Morgan, D.O. (1993). Inhibition of CDK2 Activity *In Vivo* by an associated 20K Regulatory Subunit. *Nature.* 366:707-710.
- 199.- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993). The p21 cdk-Interacting protein Cipl is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* 75:805-816.
- 200.- Xiong, Y., Shang, H., Beach, D. (1992). D-Type Cyclins Associate with Multiple Protein Kinases and the DNA Replication and Repair Factor PCNA. *Cell* 71:505-514.
- 201.- El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., (1994). WAF1/CIP1 is Induced in p53-Mediated G1 Arrest and Apoptosis. *Cancer Res.* 54:1169-1174.

- 202.- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J. (1994). P53-Dependent Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase Activities in Human Fibroblasts During Radiation Induced G1 Arrest. *Cell* 76:1013-1023.
- 203.- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994). The p21 Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases Controls DNA Replication by Interaction with PCNA. *Nature* 78:369-374.
- 204.- Rong, L.I., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994). Differential Effects by the p21 CDK Inhibitor of PCNA-Dependent DNA Replication Repair. *Nature* 371:534-537.
- 205.- Afanasyev, V.N., Korol, B., Matylevich, N.P., Pechatnikov, V.A., & Umansky, S. (1993). The Use of Flow Cytometry for the Investigation of Cell Death. *Cytometry*. 14:603-609.
- 206.- Huschtscha, L.I., Jeitner, C.E., Anderson, C.E., Bartier, W.A., and Tattersall, M.H.N. (1994). Identification of Apoptotic and Necrotic Human Leukemic Cells by Flow Cytometry. *Exp. Cell Res.* 212:161-165.
- 207.- Darzynkiewicz, D., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of Apoptotic Cells Measured By Flow Cytometry. *Cytometry*. 13: 795-808.
- 208.- Li, R., Sutphin, P.D., Swartz, D., Matas, D., Almog, N., Wolkowicz R., Goldfinger, N. Pei, H., Prokocimer, M., and Rotter, V. (1998). Mutant p53 Protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene* 16:3269-3277.
- 209.- Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:9357-9360.
- 210.- Depraetere, V., & Golstein P. (1998). Dismantling cell death: Molecular Mechanisms and Relationship to Caspase Activation. *Scand J. Immunol* 47: 523-531.
- 211.- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition Determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573-1581.
- 212.- Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, P.J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M. (1996). UCN-01: A Potent Abrogator of G₂ Checkpoint Function in Cancer Cells with Disrupted p53. *J. Natl. cancer Inst.* 88:956-965.

- 213.- Metting, N.F., Little, J.B. (1995). Transient Failure to Dephosphorylate the Cdc2-cyclin B1 Complex Accompanies Radiation-Induced G2 Phase Arrest In HeLa Cells. *Radiat. Res.* 143:286-292.
- 214.- O'Connor, P.M., Fan, S. (1996). DNA Damage Checkpoints: Implications for Cancer Therapy. *Prog. Cell Cycle Res.* 2:165-173.
- 215.- Binaschi, M., Zunino, F, Capranico, G. (1995). Mechanism of Action of DNA Topoisomerase Inhibitors. *Stem Cells* 13:369-379.
- 216.- Harker, W.G., Slade, D.L., Drake, F.H., and Parr, R.L. (1991). Mitoxantrone resistance in HL-60 leukemia cells: reduced nuclear topoisomerase activity and drug-induced DNA cleavage in association with reduced expression of topoisomerase II beta isoform. *Biochemistry* 30:9953-9961.
- 217.- Solary, E., Bertrand, R., and Pommier, Y. (1994). Apoptosis induced by topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leuk. Lymphoma* 15:21-32.
- 218.- Harker, W.G., Slade, D.L., Parr, R.L., Feldhoff, P.W., Sullivan, D.M., and Holguin, M.H. (1995). Alterations in the topoisomerase II α gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II β enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res.* 55:1707-1716.
- 219.- Nuñez, G., Benedict, M., and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245.
- 220.- Kaufman, S.H. (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta* 1400:195-211.
- 221.- Kluza, J., Lansiaux, A., Watzet, N., Mahieu, C., Osheroff, N., and Bailly, C. (2000). Apoptotic response of HL-60 human leukemia cells to antitumor drug TAS-103. *Cancer Res.* 60:4077-4084.

