



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA  
*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“Implementación de Dos Biomarcadores para la  
Determinación de Actividad Apoptótica, en el CBCM”**

**Previo a la obtención del título de  
Bioquímico Farmacéutico**

**Autor:**

**Luis Miguel Guamán Ortiz**

**Directora:**

**Dra. Natalia C. Bailón M.**

**Loja – Ecuador**

**2009**

## **CERTIFICACIÓN**

Dra.  
Natalia C. Bailón M.  
**DIRECTORA DE TESIS**

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por el Sr. Luis Miguel Guamán Ortiz, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 20 de Mayo de 2009.

-----  
Dra. Natalia C. Bailón M.  
**DIRECTORA DE TESIS**

## **AUTORÍA**

Los conceptos, ideas, metodologías, esquemas, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Luis Miguel Guamán Ortiz

## **DEDICATORIA**

Con Todo mi Amor:

A mi mamita querida, Lcda. Carmen L. Guamán O., quien con su esfuerzo y abnegado apoyo y siendo de madre y padre para mi, ha permitido que culmine mis estudios superiores para convertirme en un profesional.

A mi hermana Mayra del R. Sotomayor G., quien supo formarme con valores y responsabilidad desde pequeño tanto en mis estudios primarios como secundarios.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Dra. Natalia C. Bailón M., Docente Investigadora, Directora del Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) de la UTPL y Directora de la presente Tesis. Quien me ha sabido acoger de manera desinteresada en el área de Genética Toxicológica y quien me ha guiado generosamente en la realización del presente Trabajo.

Al Dr. PhD Luis Miguel Romero, Rector Canciller de la UTPL y a la Dra. Paula C. Torres B., Docente Investigadora y Directora de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

Al Dr. PhD Alejandro Zentella Dehesa, Investigador Titular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (México). Y al Maestro en Ciencias Biológicas (M. en C.) José Luis Ventura Gallegos, Técnico Académico del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, los cuales gracias a su contribución pudieron darnos el conocimiento necesario para el desarrollo de la presente.

A todos y cada uno de mis maestros quienes con su sabiduría me han orientado de manera teórica y práctica para poder culminar mis estudios superiores de la mejor manera.

A todos mis compañeros de ciclo, de escuela y de laboratorio, los cuales mas que amigos han sido como mis hermanos.

Finalmente agradecer a mi mamita, ya que ella es la inspiración que me ayuda a seguir luchando para triunfar en esta vida.

Sinceramente: GRACIAS

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS**

Yo, Luis Miguel Guamán Ortiz declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

-----  
Luis Miguel Guamán Ortiz  
**AUTOR**

-----  
Dra. Natalia C. Bailón M.  
**DIRECTORA DE TESIS**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Certificación	ii
Autoría	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contrato de Cesión de Derecho de Tesis	vi
Índice de Contenidos	vii
Resumen	x
Abstrac	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Apoptosis	1
1.1.1. El Inicio	2
1.1.2. La Decisión	3
1.1.2.1. La Vía Extrínseca	4
1.1.2.2. La Vía Intrínseca	5
1.1.3. La Ejecución	7
1.1.3.1. Caspasas	7
1.1.3.2. Debilitamiento del Citoesqueleto	8
1.1.3.3. Degradación del Núcleo y del Material Genético	8
1.1.3.4. Degradación de Organelas	8
1.1.3.5. Cuerpos Apoptóticos	9
1.1.4. La Ablución	9
1.2. Desregulación de la Apoptosis	11
1.2.1. Alteraciones de la Vía Extrínseca	11
1.2.2. Alteraciones de la Vía Intrínseca	12
1.3. Una Alternativa para Nuevos Antineoplásicos	12
1.4. Biomarcadores Apoptóticos	13
1.5. Otros Tipos de Muerte Celular	17
1.5.1. Necrosis	17
1.5.2. Senescencia	17
1.5.3. Autofagia	18
1.5.4. Catástrofe Mitótica	18
1.5.5. Oncosis	19
1.5.6. Piroptosis	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1. Esquema del Proceso	21
3.2. Cultivo Celular	22
3.3. Tratamiento: Doxorrubicina	22
3.4. Viabilidad por Captación de FDA-BrEt	23
3.5. Actividad de Caspasas	24
3.6. Externalización de la FS	26
3.7. Análisis Estadístico	26
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
4.1. Viabilidad Celular	27
4.2. Actividad de Caspasas	29
4.3. Externalización de FS	32
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>37</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>44</b>
 <b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b>	
1. Foto 1: Célula en proceso apoptótico	1
2. Foto 2: Células apoptóticas	15
3. Foto 3: Línea celular RKO	28
 <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
1. Figura 1: Vía extrínseca de la apoptosis	4
2. Figura 2: Vía intrínseca de la apoptosis	5
3. Figura 3: Proceso apoptótico	9
4. Figura 4: Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos	10
5. Figura 5: Externalización de la FS	10
6. Figura 6: Anexina V	14
7. Figura 7: Sustrato Ac-DEVD	16
8. Figura 8: Proceso Necrótico	17
9. Figura 9: Molécula de la Doxorrubicina	22

## INDICE DE GRÁFICAS

1. Gráfica 1: Curva Estándar	25
2. Gráfica 2: Porcentaje de células viables	28
3. Gráfica 3: Actividad de caspasa 3	30
4. Gráfica 4: Inhibición de la caspasa 3	31
5. Gráfica 5: Porcentaje de células apoptóticas	32
6. Gráfica 6: Porcentaje de células apoptóticas, vivas y muertas	34
7. Gráfica 7: Comparación entre el porcentaje de células apoptóticas y la activación de caspasa 3	35

## **RESUMEN**

La apoptosis es una muerte genéticamente controlada, que se activa para eliminar células embrionarias y enfermas, permitiendo el desarrollo y el buen funcionamiento del organismo sin afectar a las células normales. Debido a ello, este tipo de muerte se ha convertido en una de las mejores alternativas para el desarrollo de nuevos antineoplásicos capaces de activar esta vía de muerte, con el objetivo de evitar respuestas desfavorables en los pacientes que generalmente se desarrollan con la quimioterapia. Las técnicas que permiten determinar apoptosis han evolucionado a través de los años desde que Kerr, mediante el microscopio electrónico descubrió este modelo de muerte celular. En el CBCM de la UTPL, se han implementado dos de estas técnicas con la ayuda de los biomarcadores Caspasa 3 y Anexina V, permitiendo la determinación de la activación de caspasas y la externalización de la Fosfatidilserina respectivamente; eventos característicos que ocurre solo en condiciones apoptóticas. Para ello se empleó el modelo biológico RKO y el antineoplásico Doxorubicina como agente inductor.

**Palabras Clave:** Apoptosis, Biomarcador, Anexina V, Caspasa 3.

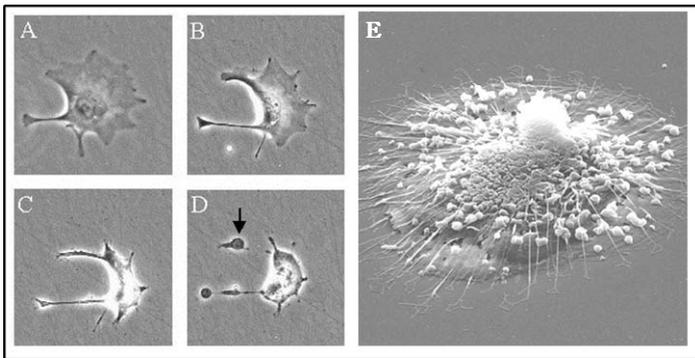
## **ABSTRACT**

Apoptosis is a genetically and controlled death, it is activated to eliminate embryonic and ill cells, allowing the development, the right working of the organism, and not affecting normal cells. Therefore, apoptotic pathway has become one of the best alternatives to develop new antineoplastic drugs which could activate this death pathway, in order to avoid adverse responses that generally are developed with chemotherapy on patients. The techniques for determining apoptosis have evolved over the years since Kerr, who through using electron microscopy found out this model of cell death. In the CBCM-UTPL, we have implemented two of these techniques with the help of biomarkers Caspase 3 and Annexin V, which allowed the determination of caspase activation and externalization of phosphatidylserine, respectively; characteristic events that occur only in apoptotic conditions. It was used the RKO cells as the biological model, and the doxorubicin as inductor agent.

**Key Words:** Apoptosis, Biomarker, Annexin V, Caspase 3.

## 1. INTRODUCCIÓN

Cerca de cien mil células en mamíferos son producidas cada segundo por mitosis y un número similar de células mueren al mismo tiempo por apoptosis (Amelio, *et al.* 2007). Este fenómeno ocurre gracias al equilibrio homeostático que existe entre la proliferación y muerte celular (Krysko, *et al.* 2008); sin embargo, dicho equilibrio suele ser alterado por diversos agentes que proporcionan un nivel de proliferación ilimitado, en el cual las células afectadas evaden la apoptosis (Ashkenazi, 2008).



Fuente: ALSA, 2009; FotCiencia, 2009

**Foto 1. Célula en proceso apoptótico**, observada a través de microscopía electrónica. A) célula afectada. B) condensación nuclear y celular. C) cambios morfológicos notorios. D y E) cuerpos apoptóticos de la célula muerta.

### 1.1. APOPTOSIS

A mediados del siglo XIX se determinó que la muerte celular cumple una función fisiológica importante en organismos multicelulares. Los estudios realizados en esa época revelaron que durante el desarrollo del embrión las células no morían accidentalmente, sino, a través de una serie de reacciones bioquímicas genéticamente controladas; introduciendo así el término "*Muerte celular programada*". Subsecuentemente, durante un experimento con células neoplásicas, Kerr en 1972 descubrió que muchas de las células de sus cultivos desaparecían. Esto llevó a realizar un estudio de imágenes cinemáticas (Foto 1) que mostraron mediante microscopía

electrónica que las células morían dividiéndose en pequeñas vesículas en las cuales encontró el núcleo condensado y las organelas degradadas. Relacionando los estudios anteriores con el de Kerr se pudo identificar un nuevo modelo de muerte celular, la *Apoptosis* (Blankenberg, 2008; Gewies, 2003).

La término Apoptosis se deriva de las palabras griegas “*apo*” y “*ptosis*” cuyo significado “*Caída de las hojas en otoño*”, esta estrechamente relacionado con el proceso por el cual las células enfermas se separan de las células sanas, con el objetivo de morir discretamente y sin afectar al resto del tejido (Schinoni y Parana, 2006). Es por ello que la apoptosis o muerte celular programada, se define como un “suicidio celular” en beneficio para el organismo, que se activa para: el desarrollo de células embrionarias, el mantenimiento de la homeostasis tisular y eliminar células enfermas y dañadas (Sinha y El-Bayoumy, 2004; Chipuk y Green, 2006).

La apoptosis posee cuatro etapas: El Inicio, en donde los estímulos o señales de muerte desencadenan sus efectos sobre las células. La Decisión, en donde la maquinaria apoptótica es activada y, dependiendo del daño que hayan recibido, las células aun pueden decidir si morir o no. La Ejecución, en donde todos los mecanismos proteolíticos ya se encuentran activados, de tal manera que la muerte de la célula es inevitable. Y finalmente la Ablución o Limpieza, en donde los cuerpos apoptóticos, producto de la degradación de la célula muerta son fagocitados por macrófagos (Jordan y Harrison, 2003).

### **1.1.1. El Inicio**

La apoptosis puede ser iniciada por una amplia variedad de agentes a través de procesos tanto fisiológicos como patológicos, los cuales estimulan a los receptores de muerte de la célula o causan daño directamente al ADN.

Fisiológicamente, durante el desarrollo embrionario, la apoptosis se activa para el remodelamiento de las diferentes estructuras del organismo ya sea para liberar espacio o para dar paso a la formación de un nuevo tejido u órgano. La apoptosis también se

activa para eliminar células que están demás, producto de una sobreproliferación que se da en ciertos casos de hiperplasia y en procesos de cicatrización (Elmore, 2007; Li, *et al.* 2004; Jordan y Harrison, 2003). En fin, la apoptosis evita que nuestras manos tengan membranas, que persistan nuestras colas embrionarias, que el sistema inmunitario responda a nuestras propias proteínas y que nuestro cerebro se llene de conexiones eléctricas inútiles (Lodish, *et al.* 2005).

Patológicamente, agentes externos tales como bacterias, virus, compuestos químicos, radiación, entre otros; alteran el metabolismo normal de la célula, conduciéndola hacia la muerte. Los agentes hereditarios o internos, también toman lugar en la patología de la célula; la exposición del ADN a los agentes externos puede alterar el genoma, produciendo mutaciones o activando a genes con carácter patológico como los oncogenes (Jordan y Harrison, 2003).

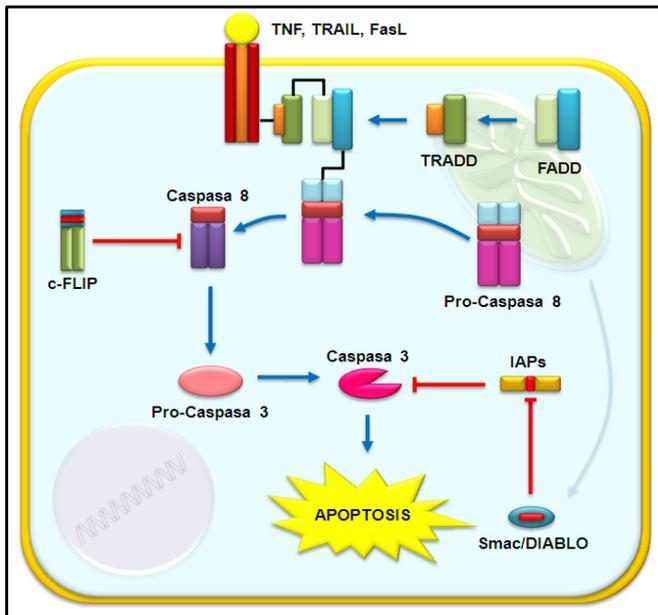
El efecto de los agentes externos así como de los agentes internos resulta en el desarrollo de diferentes patologías en las que incluyen: SIDA, isquemia, enfermedades neurodegenerativas e incluso cáncer; de tal manera que la célula afectada activa la apoptosis para “suicidarse” con el objetivo de proteger el resto del organismo (Elmore, 2007; Chipuk y Green, 2006).

### **1.1.2. La Decisión**

Durante el inicio de la apoptosis, las células activan una serie de proteínas que conforman la maquinaria de reparación la cual les permite decidir de entre seguir viviendo o morir. Una de estas proteínas es PARP (*Poly ADP ribose polymerase*), presente en el núcleo y con un peso de 113 kDa, se activa en respuesta a la sobreexpresión de p53, cortando secuencias de aminoácidos de ADN que han sido sometidas a radicación o a agentes nocivos (Kiss y Szabó, 2005). Además, p53, como guardián del genoma, estimula la expresión de otras proteínas que detienen el ciclo celular y que regulan la apoptosis. Si dicho daño resultó ser irreparable o no se dio a tiempo las células deciden morir (Offer, *et al.* 2002). Mientras que la maquinaria de reparación realiza su trabajo, la apoptosis puede cursar dos vías en las cuales se

desencadenan una serie de reacciones bioquímicas con el propósito de activar a las proteínas pro-apoptóticas y caspasas.

### 1.1.2.1. La Vía Extrínseca



Fuente: Autor

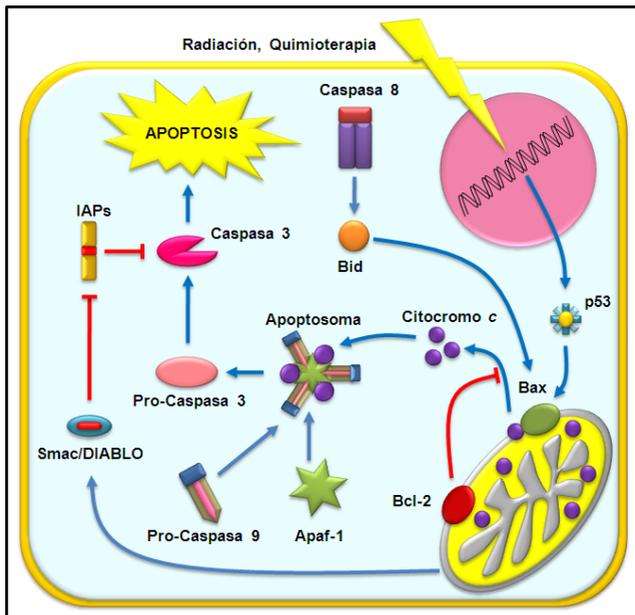
**Figura 1. Vía Extrínseca de la apoptosis**, iniciada por NK, linfocitos T que estimulan a los receptores de muerte: TNF, TRAIL y FasL; desencadenando una serie de procesos bioquímicos que terminan en la activación de la caspasa 3.

Las células especializadas que conforman el sistema inmune tales como las NK, linfocitos T, entre otros factores citotóxicos, producen ligandos pro-apoptóticos que se expresan en su superficie o que liberan dentro del espacio extracelular. Estos ligandos: TNF (*Tumor necrosis factor*), TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) y FasL (*Fas ligand*), se unen a los receptores de muerte producidos por las células enfermas que se exponen sobre su superficie (Ashkenazi, 2008; Mehlen y Puisieux, 2006). Ya en el citoplasma, estos ligandos reclutan a TRADD (*TNF-R1 associated death domain*) y subsecuentemente

a FADD (*Fas activating death domain*), proteínas adaptadoras intracelulares (Fig. 1). FADD, a través de un anclaje activa a la caspasa 8 y esta mediante clivación activa a la caspasa 3 (Blankenberg, 2008).

La activación de esta vía puede ser inhibida por la proteína pro-apoptótica c-FLIP (*Cellular-FLICE inhibitory protein*), la cual posee una estructura similar a la caspasa 8. La particularidad que posee c-FLIP puede ser confundida por FADD, de tal manera que se bloquea el sitio de anclaje de la caspasa 8. Por otro lado, IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*), un grupo de proteínas anti-apoptóticas, pueden inactivar directamente tanto a la caspasa 3 como a la caspasa 7, e incluso inhibir la función de otras caspasas (Ryang, *et al.* 2007; Nagane, *et al.* 2001; LaCasse, *et al.* 1998).

### 1.1.2.2. La Vía Intrínseca



Fuente: Autor

**Figura 2. Vía Intrínseca de la apoptosis**, iniciada por factores que alteran el ADN, desencadenando una serie de procesos bioquímicos mediados por p53, que termina en la activación de la caspasa 3.

También conocida como la vía mitocondrial. Esta vía se encuentra netamente controlada por tres grupos pertenecientes a la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). La primera subfamilia se caracteriza por poseer cuatro dominios Homólogos a Bcl-2: BH1, BH2, BH3 y BH4; y los miembros que la conforman son: **Bcl-2**, Bcl-XL y Mcl-1, las cuales poseen carácter anti-apoptótico. La segunda subfamilia posee de uno a tres dominios, pero carece del dominio BH4; y los miembros que la conforman son **Bax**, Bak y Bok y poseen carácter pro-apoptótico. Y la tercera subfamilia posee únicamente el dominio **BH3** y los miembros que la conforman son Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma y Noxa, e igualmente poseen carácter pro-apoptótico (Ashkenazi, 2008; Rashmi, *et al.* 2008; Amelio, *et al.* 2007).

Los daños que sufre el ADN (Fig. 2), inducidos por radiación, quimioterapia, oncogenes, hipoxia y estrés ribosomal, estimulan la sobreexpresión de p53, de tal manera que esta se acumula en el núcleo para regular la expresión de otros genes que codifican proteínas pro-apoptóticas. Una de ellas es la subfamilia Bax, la cual origina poros o canales a nivel de membrana mitocondrial, aumentando la permeabilidad para permitir la liberación de citocromo c, que en conjunto con Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y la pro-caspasa 9 forman un complejo denominado Apoptosoma. Dicho complejo mediante clivación activa a la caspasa 3.

El efecto de Bax puede ser potenciado gracias a la actividad pro-apoptótica de la subfamilia BH3 mediada por la caspasa 8; así mismo, puede ser inhibido por la subfamilia anti-apoptótica Bcl-2 (Ashkenazi, 2008; Reed y Pellecchia, 2005). p53 también induce la expresión de otros genes que codifican varias proteínas que regulan el ciclo celular; una de estas proteínas es p21, la cual se activa para inhibir la función de las CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) en la fase G1; interrumpiendo la proliferación y conduciendo a la célula hacia la muerte (Dey, *et al.* 2008; Ju, 2007; Chipuk y Green, 2006; Sak, *et al.* 2003).

La activación de la caspasa 3 y de las otras caspasas ejecutoras, como resultado tanto de la vía extrínseca como la intrínseca; promueven a la continuación del proceso apoptótico,

en donde ya no existe un retroceso por el cual las células puedan escapar de la muerte.

### **1.1.3. La Ejecución**

En esta etapa de la apoptosis se desatan una serie de eventos proteolíticos sobre las principales proteínas que mantienen la integridad y funcionalidad de las células. Dichos eventos son ejecutados de una manera precisa y eficiente por las caspasas ejecutoras (Blankenberg, 2008).

#### **1.1.3.1. Caspasas**

Las caspasas o también conocidas como DNAsas, son un grupo de catorce proteínas que conforman la familia las cistein aspartato proteasas, del cual deriva su nombre (Gewies, 2003). Son sintetizadas en forma de zimógenos o pro-caspasas y se activan en respuesta a los estímulos apoptóticos. Se caracterizan por presentar un residuo terminal de cisteína el cual media la ruptura de otras proteínas a nivel de un ácido apártico (Kaufmann, *et al.* 2007; Chipuk y Green, 2006).

Esta familia se subdivide en caspasas inductoras y caspasa efectoras (Kaufmann, *et al.* 2007). Las caspasas inductoras como la caspasa 8 y 10, procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras para su subsecuente activación, ejemplo: la caspasa 8 activa a la caspasa 3 (Fig. 1). Y las caspasas efectoras como la caspasa 3, 6 y 7, procesan sustratos esenciales para la célula, ejemplo: la caspasa 3 inactiva mediante clivación a PARP (O'Valle, *et al.* 2006; Oliva, *et al.* 2006). Hasta la fecha se han identificado aproximadamente 400 sustratos de las caspasas efectoras (Taylor, *et al.* 2008).

No toda la familia de las cistein aspartato proteasas participa en la apoptosis. Se conoce que las caspasas 1, 4, 5 y 12 se activan en procesos inflamatorios, en donde la muerte celular resulta en respuesta a infecciones tanto bacterianas como virales (Taylor, *et al.* 2008; Fink y Cookson, 2005).

### **1.1.3.2. Debilitamiento del Citoesqueleto**

El citoesqueleto esta constituido por proteínas de actina, miosina, vimentina, entre otras; que en conjunto forman la estructura que le da la rigidez a la célula, además de actuar como carretes transportadores de otras proteínas. En apoptosis, estos se convierten en los sustratos para las caspasas, las cuales mediante proteólisis clivan dicha estructura y a las proteínas de adhesión presentes en la superficie de la membrana citoplasmática, provocando la debilitación y el desmantelamiento del citoesqueleto (Taylor, *et al.* 2008).

### **1.1.3.3. Degradación del Núcleo y del Material Genético**

Las caspasas reconocen como sustratos a las proteínas que conforman la lámina y la envoltura nuclear, lisándola y disgregándola. El ADN presente en el núcleo se degrada por acción de CADs, (*Caspase activated DNases*) a nivel de los nucleosomas y se condensa en numerosas secuencias de 200 pb aproximadamente. La condensación del ADN evita que se desaten respuestas antigénicas de la cromatina en el espacio extracelular y además facilita el trabajo de fagocitosis a los macrófagos. Así mismo, los factores responsables tanto de la síntesis y transcripción del ADN como traducción de proteínas también son inactivados por las caspasas, inhibiendo totalmente la proliferación celular (Taylor, *et al.* 2008).

### **1.1.3.4. Degradación de Organelas**

El aparato de Golgi y el Retículo Endoplasmático también resultan ser afectados. Las proteínas que conforman estas organelas también toman el papel de sustratos de caspasas, clivando sus estructuras e inhabilitando sus respectivas funciones (Hicks y Machamer, 2005). La mitocondria también sufre un cierto tipo de fragmentación, pero a diferencia del resto de organelas, este fenómeno no es dependiente de caspasas. La mitocondria, durante la apoptosis aumenta su permeabilidad para liberar componentes que ayudan a la activación de las caspasas; como consecuencia, dicha permeabilidad también permiten la entrada de agua y otros solutos, incrementando el

volumen de la mitocondria seguido del estallido de esta organela (Taylor, *et al.* 2008; Martinou, *et al.* 2000).

### 1.1.3.5. Cuerpos Apoptóticos

La fase terminal de la demolición celular se caracteriza por la formación de vesículas o ampollas a partir de las células apoptóticas. Tanto la cromatina condensada como las organelas degradadas son envueltas mediante un englobamiento y extirpamiento de de la membrana citoplasmática, formando así estructuras vesiculares conocidas como los cuerpos apoptóticos (Fig. 3). La membrana aun se conserva intacta, evitando que los componentes intracelulares salgan a la matriz extracelular (Taylor, *et al.* 2008).



Fuente: Autor

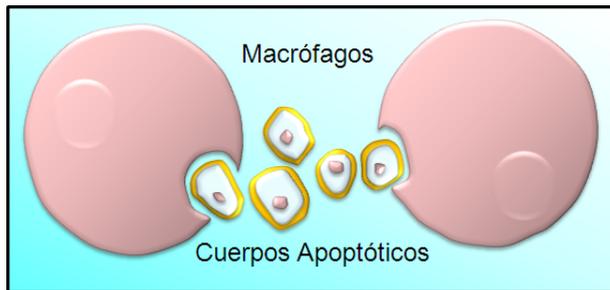
**Figura 3. Proceso apoptótico.** Una célula normal es afectada por diversos factores, la morfología de la célula cambia dinámicamente hasta llegar a formar los cuerpos apoptóticos que luego serán fagocitados.

### 1.1.4. La Ablución

Finalmente los cuerpos apoptóticos son reconocidos rápidamente por macrófagos para ser englobados y digeridos (Fig. 4). Probablemente, la extirpación de la célula en vesículas pequeñas podría facilitar la fagocitosis ya que la célula como tal resulta ser demasiado grande para ser englobada (Taylor, *et al.* 2008; Schlegel y Williamson, 2007; Jordan y Harrison, 2003).

La afinidad de los macrófagos hacia los cuerpos apoptóticos se da gracias una serie de receptores atrayentes que se expresan y exponen en la superficie de la membrana de las células apoptóticas. Característicamente, uno de estos receptores es la Fosfatidil Serina (FS), un fosfolípido sintetizado en el retículo endoplasmático y transportado exclusivamente hacia la cara

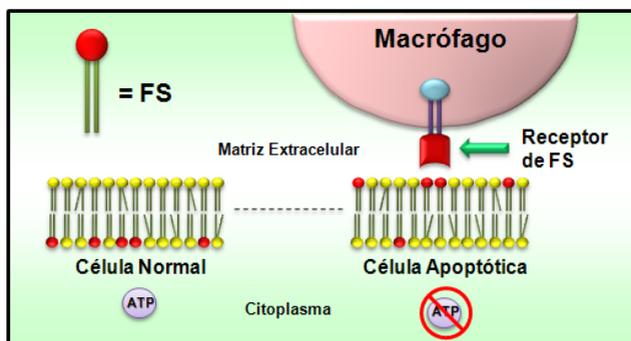
interna de la membrana citoplasmática (Blankenberg, 2008; Balasubramanian y Schroit, 2003).



Fuente: Autor

**Figura 4. Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos**, que son reconocidos por macrófagos gracias a receptores que se desarrollan sobre la superficie de las células apoptóticas.

La estabilidad que posee la membrana citoplasmática esta mediada por procesos dependientes de ATP (Balasubramanian y Schroit, 2003), por lo tanto; la liberación de citocromo c implica una disminución de la síntesis de ATP, promoviendo un desequilibrio de dicha membrana y causando la pérdida de la asimetría de la FS (Fig. 5). La FS se externaliza para actuar como un receptor para ser reconocida por macrófagos (Schlegel y Williamson, 2007; Sreedhar y Csermely, 2004).



Fuente: Autor

**Figura 5. Externalización de la FS** en células apoptóticas por la cual son reconocidas por macrófagos mediante un receptor de FS.

## 1.2. DESREGULACIÓN DE LA APOPTOSIS: CÁNCER

La desregulación de la apoptosis se debe a los diferentes agentes que impiden que la célula muera, de tal manera que se desarrollan diferentes tipos de patologías, entre ellas el cáncer (Muños, *et al.* 2005; Okada y Mak, 2004), siendo esta la principal causa de mortalidad a nivel mundial, representando el 13 % de las defunciones en el 2007 y cuya cifra sigue aumentando año tras año (WHO, 2009).

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizada por una proliferación incontrolada de células anormales que terminan en la formación de un tumor. Esta patología es causada por agentes externos (tabaco, químicos, radiación y microorganismos) y agentes internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunes y alteraciones del metabolismo); los cuales pueden trabajar en conjunto o individualmente para inducir a una carcinogénesis (ACS, 2008). Dichos agentes producen mutaciones en el genoma, alterando a los diferentes factores encargados de regular el ciclo celular en los que destaca p53.

### 1.2.1. Alteraciones de la Vía Extrínseca

Cuando las mutaciones se dan a nivel de los receptores de muerte, las células apoptóticas pierden la susceptibilidad a los ligandos pro-apoptóticos creados por linfocitos y células NK, de tal manera que las células dañadas no pueden ser reconocidas para la inducción de muerte. Como resultado, la célula puede entrar en un estado de senescencia o proliferar ilimitadamente (Reed y Pellecchia, 2008).

La sobreexpresión de tanto de c-Flip como de IAPs también pueden promover a la inhibición de apoptosis. Los altos niveles de c-Flip bloquean el sitio de anclaje de la pro-caspasa 8 a FADD, evitando la activación de la caspasa 3 y de la subfamilia BH3. Así mismo la sobreexpresión de IAPs resulta en la inactivación de las caspasa efectoras y aún más si también se encuentra mutada la proteína pro-apoptótica smac/DIABLO (*Second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI*), que se libera desde la mitocondria

(Fig. 2) en conjunto con el citocromo *c*, para inactivar a IAPs (Ryang, *et al.* 2007; Nachmias, *et al.* 2004; Nagane, *et al.* 2001).

### **1.2.2. Alteraciones de la Vía Intrínseca**

La víctima principal es p53, mutado aproximadamente en el 50 % de los diferentes tipos de cánceres (Ashkenazi, 2008; Dey, *et al.* 2007; Ju, 2007). En respuesta a los daños que recibe el ADN, la sobreexpresión de p53 mutado resulta ser inútil, ya que este no se encuentra apto para dirigir la expresión de los genes que regulan tanto la apoptosis como el ciclo celular. De este modo, las células con p53 mutado evaden la apoptosis e incrementan la velocidad del desarrollo del tumor (Chipuk y Green, 2006; Sinha y El-Bayoumy, 2004; Yang, *et al.* 2001).

Las mutaciones que sufren la familia de las Bcl-2 también se destacan en el cáncer. La pérdida del control de la proliferación celular e incluso la resistencia a ciertos tipos de fármacos antineoplásicos esta relacionado con la sobreexpresión de Bcl-2 (Amelio, *et al.* 2007). Los altos niveles de esta proteína anti-apoptótica bloquean por completo la función que cumple la subfamilia pro-apoptótica Bax y BH3, inhibiendo la liberación de citocromo *c* (Lessene, *et al.* 2008; Rashmi, *et al.* 2008).

### **1.3. ALTERNATIVA PARA NUEVOS ANTINEOPLÁSICOS**

El tratamiento del cáncer se enfoca principalmente en los agentes externos, ya que estos son preventivos a diferencia de los agentes internos. Además, representan el mayor porcentaje de producir cáncer a nivel mundial. El tratamiento más utilizado es la quimioterapia, la cual se basa en la administración intravenosa de fármacos antineoplásicos que producen efectos citotóxicos en las células cancerígenas. Sin embargo, la quimioterapia no es específica, ya que también afecta a las células normales provocando efectos adversos severos sobre los pacientes (Tsao, *et al.* 2004).

La inducción de apoptosis y la inhibición de la proliferación celular son eventos importantes que podrían ser útiles para el tratamiento de esta patología (Philchenkov, 2006; Debatin, 2004). La búsqueda de nuevos quimioterapéuticos se basa en

que estos puedan reactivar a las proteínas pro-apoptóticas o inactivar a las anti-apoptóticas. Es por ello que el interés por encontrar nuevos compuestos capaces de activar la apoptosis ha ido incrementado a través de los años (Anto, *et al.* 2002). A pesar de ello, se ha demostrado que existen quimioterapéuticos que pueden conferir resistencia a ciertos tipos de cáncer, además de producir tumores secundarios (Ashkenazi, 2008).

#### 1.4. BIOMARCADORES APOPTÓTICOS

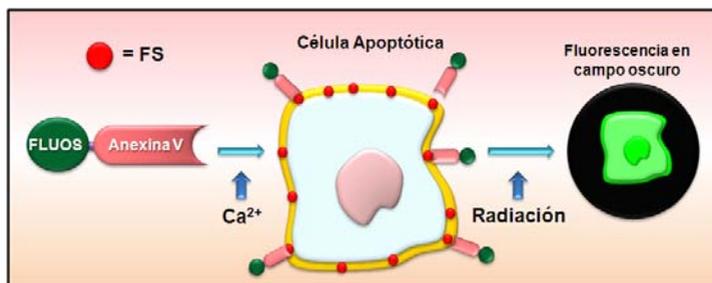
En un inicio, la apoptosis solo podía ser detectada mediante los cambios morfológicos que sufrían las células. A medida que la ciencia avanzaba, se desarrollaron varios métodos que hasta la actualidad han permitido la identificación y confirmación de esta vía de muerte (Jordan y Harrison, 2003). La serie de eventos bioquímicos que ocurren durante la apoptosis pueden ser detectados a través del uso de “*biomarcadores*” que actúan como indicadores de uno o varios procesos, ya sean normales, patológicos o farmacológicos, los cuales pueden ser medidos y analizados (Cummings, *et al.* 2008).

Los métodos microscópicos aún se mantienen como estándares en la detección de apoptosis. El microscopio electrónico fue la primera herramienta útil desde que Kerr pudo identificar este tipo de muerte (Elmore, 2007). La tinción de las células resulta ser de gran ayuda para la observación y cuantificación a través del microscopio. Tinciones desde el Azul Tripán hasta los Fluorocromos han evolucionado no solo para la determinación de la viabilidad celular, sino incluso para la detección de actividad apoptótica. De esta manera la tecnología ha desarrollado técnicas que mediante el uso de biomarcadores permiten identificar los eventos característicos que ocurren durante la apoptosis (Bivén, *et al.* 2003).

Uno de los eventos claves de la apoptosis es el fraccionamiento de la doble cadena de ADN en pequeñas porciones de 200 pb. Los  $^3\text{OH}$  terminales presentes en los extremos 3' de cada fracción anclan moléculas de Br-dUTP (*Bromodeoxyuridine triphosphate*) la cual es polimerizada por una TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*). La formación de cadenas de Br-dUTP es detectada por un anticuerpo conjugado a un

fluorocromo (FICT). Esta técnica es comúnmente llamada TUNEL (*Terminal transferase dUTP nick end labeling*), el cual mediante citometría de flujo permite identificar cualitativa y cuantitativamente a las células apoptóticas gracias a la fluorescencia emitida por el fluorocromo (Darzynkiewicz, *et al.* 2008).

La electroforesis en geles de agarosa también es una técnica útil para determinar apoptosis, los fluorocromos Bromuro de Etidio (BrEt) o Ioduro de Propidio (IP), interactúan directamente con el ADN, los cuales mediante radiación emiten una fluorescencia roja; observando un efecto “escalera” de las bandas formadas por los diferentes fragmentos de ADN. Si al contrario, se observa un efecto de “barrido” podemos decir que se trata de una necrosis (Westernmeier, 2001; Zhivotovsky, *et al.* 1999).



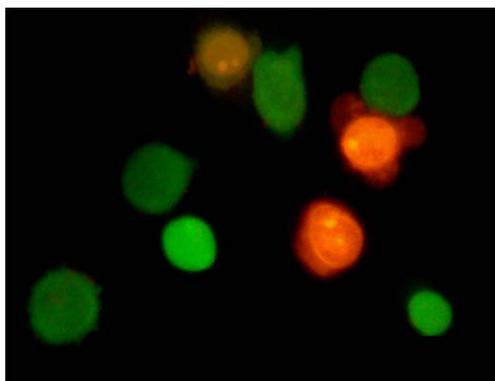
Fuente: Autor

**Figura 6.** Anexina V conjugada a FLUOS, la cual, en presencia de  $Ca^{2+}$ , es capturada por la FS externalizada sobre la membrana de las células apoptóticas y mediante radiación emite una fluorescencia verde.

La Anexina V es una proteína anticoagulante presente por lo general en la placenta humana y fue identificada y nombrada inicialmente como  $VAC\alpha$  (*Vascular anticoagulant  $\alpha$* ) por Andree, *et al.* en 1990. En presencia de  $Ca^{2+}$ , dicha proteína posee una alta afinidad a la FS. (Balasubramanian y Schroit, 2003). Para detectar actividad apoptótica, la Anexina V es conjugada a un fluorocromo (FLUOS); de este modo, la FS serina presente en la cara externa de las células apoptóticas captura la Anexina V-FLUOS (Fig. 6). Este complejo dependiente de  $Ca^{2+}$ , mediante radiación emite una fluorescencia verde (Foto 2) que revela a

las células apoptóticas, las cuales pueden ser detectadas por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

Para diferenciar a las células apoptóticas de las necróticas, se emplea BrEt o IP, los cuales pueden introducirse fácilmente en las células con la membrana citoplasmática fragmentada interactuando directamente con el ADN. Mediante radiación, las células necróticas emiten fluorescencia roja (Foto 2) que de igual manera puede ser detectado por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (Laufer, *et al.* 2008; Jones y Senft, 1985).

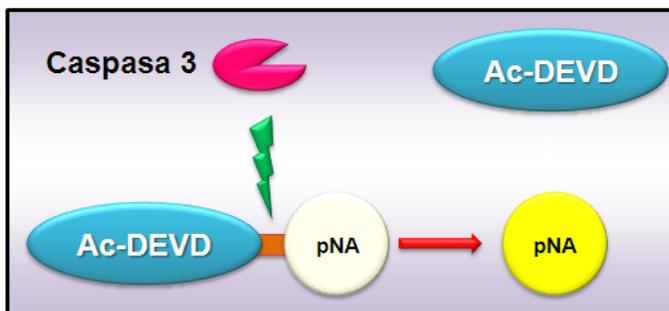


*Fuente: Autor*

**Foto 2. Células apoptóticas** (verdes) teñidas con Anexina V y células necróticas (rojas) teñidas con IP. Observadas mediante microscopía de fluorescencia a 40 X, con un filtro de 450 – 490 nm de excitación y 515 nm de emisión.

La activación de enzimas propias de la apoptosis también es evento clave de este tipo de muerte. Principalmente las caspasas, son activadas para la proteólisis de las proteínas que le dan la integridad y funcionalidad a la célula. En 1992, Thornberry y colaboradores, determinaron varias secuencias de aminoácidos que podían ser clivados por la ICE, ahora reconocida como caspasa 1 (Raupach, *et al.* 2006). Dicho estudio sirvió para la elaboración de varios sustratos sintéticos los cuales pueden ser clivados por las caspasas; uno de ellos es el Ac-DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), una secuencia de aminoácidos que la podemos encontrar codificada en la

proteína PARP y el cual se puede encontrar conjugado a un cromóforo (pNA). Este sustrato es clivado al ser expuesto a la caspasa 3 (Fig. 7) o a la caspasa 7, de tal manera que se libera la pNA emitiendo una coloración amarilla que pueden ser monitoreadas a 405 nm por espectrofotometría (Clontech, 2009; Yang, *et al.* 2001).



Fuente: Autor

**Figura 7. Sustrato Ac-DEVD** conjugado a pNA. Clivado por la caspasa 3 emitiendo una coloración amarilla como resultado de la liberación de pNA.

La sobreexpresión de las diferentes proteínas anti y pro-apoptóticas como Bcl-2 o p53 respectivamente, o la clivación por caspasas de sustratos proteicos como PARP, también toman el papel de biomarcadores, los cuales son analizados a través de Inmunohistoquímica o comúnmente conocido como Western Blot. Este ensayo consiste en la identificación y cuantificación de proteínas específicas de una mezcla compleja, reconocidas gracias al uso de anticuerpos. El proceso por el cual las proteínas son identificadas consiste en: desnaturalización de proteínas, electroforesis en gel SDS-PAGE, electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, inmunoblot con los anticuerpos y el revelado de bandas mediante quimioluminiscencia (Sambrook y Russell, 2001).

En el presente trabajo, como objetivo principal hemos decidido implementar dos de estas técnicas en el Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) de la UTPL, con el fin de identificar compuestos capaces de inducir muerte por apoptosis en células tumorales. El primero consiste en un ensayo fluorométrico

utilizando *Anexina V* como biomarcador de la externalización de la FS. Y el segundo consiste en un ensayo colorimétrico utilizando un kit que incluye Ac-DEVD-pNA para la determinación de la activación de la *Caspasa 3*.

## 1.5. Otros Tipos de Muerte Celular

### 1.5.1. Necrosis

Es un tipo de muerte violenta y accidental, inducida por factores fisiopatológicos, como la escases o ausencia de los mecanismos de adaptación y resistencia o por agentes nocivos; este proceso de muerte es irreversible, y se caracteriza por el incremento del volumen celular (Fig. 8), degradación de organelas y del material genético, la hinchazón de la célula da como resultado la fragmentación de la membrana citoplasmática. Una vez que se liberan en la matriz extracelular los componentes internos de la célula muerta, estos toman el papel de antígenos, provocando una respuesta autoinmune dando como resultado la inflamación (Taylor, *et al.* 2008; Chipuk y Green, 2006). Los métodos para identificar este tipo de muerte son a través de la tinción de celular o del ADN con BrEt o IP para analizar en citómetro de flujo o electroforesis respectivamente (Okada y Mak, 2004).



Fuente: Autor

**Figura 8. Proceso Necrótico**, la célula afectada se hincha hasta romper su membrana, liberando su contenido intracelular al exterior, causando una respuesta inflamatoria en presencia de linfocitos.

### 1.5.2. Senescencia

Se caracteriza por la pérdida de la capacidad de replicación y por cambios morfológicos como el aumento de la granularidad. Este fenómeno puede ocurrir de dos maneras: La primera se

relaciona al envejecimiento de las células, debido al acortamiento de los telómeros en cada fase S del ciclo celular. Los telómeros forman gran parte de la integridad de los cromosomas y son necesarios en la replicación de las células; sin embargo, los telómeros son regiones de ADN no codificantes y su síntesis no se da en la mayoría de las células (Okada y Mak, 2004). Por otro lado, este tipo de muerte ocurre gracias a diversos daños ocasionados en el ADN que detienen por completo el ciclo de vida celular (Dey, *et al.* 2008; Jordan y Harrison, 2003). Las técnicas para determinar este tipo de muerte pueden ser a través de ensayos de inhibición de la proliferación celular (Okada y Mak, 2004).

### **1.5.3. Autofagia**

Es el proceso por el cual las células se comen así mismas debido a la escasez de nutrientes en su entorno. Este tipo de muerte, dependiente de GTPasas y quinasas de fosfatidilinositol, se caracteriza por la degradación de los componentes intracelulares y condensación de la cromatina. Morfológicamente las células forman un tipo de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales engloban a los componentes intracelulares para su respectiva degradación previa fusión con lisosomas en un proceso dependiente de microtúbulos. Las células que sufren autofagia pueden ser fagocitadas por macrófagos o células vecinas. Las técnicas para determinar este tipo de muerte pueden por degradación de proteínas (Fink y Cookson, 2005).

### **1.5.4. Catástrofe Mitótica**

Se produce cuando una célula prematura es forzada a la proliferación, causando fallas en los sistemas de chequeo del ciclo celular en donde se detiene la mitosis antes o durante el proceso. Durante la mitosis de las células prematuras, se forman múltiples micronúcleos y la cromatina no llega a condensarse, de tal manera que se forman aberraciones cromosómicas debido a la mala distribución cromosómica, induciendo por lo tanto a la suspensión del ciclo celular por inhibición de las CDKs por acción de p53. Las técnicas para

identificar este tipo de muerte incluyen la determinación de marcadores mitóticos (Okada y Mak, 2004).

### **1.5.5. Oncosis**

Se caracteriza por la hinchazón tanto de las organelas como de la célula misma, incremento de la permeabilidad y pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática. Producidas por un agotamiento de la reserva energética y fallas de las bombas iónicas en la membrana citoplasmática que incrementan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula. Agentes nocivos pueden activar procesos en donde se requiere gran cantidad de ATP, de esta manera la reserva energética se consume inactivando otros procesos dependientes de ATP necesarios para la célula. En cambio, los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede resultar en la activación de proteínas pertenecientes a la familia de la calpaína; las cuales al igual que las caspasas poseen actividad proteolítica; esencialmente a nivel de las proteínas que mantienen la integridad de la membrana citoplasmática. Como resultado, la célula revienta, liberando sus componentes intracelulares al igual que necrosis (Fink y Cookson, 2005).

### **1.5.6. Piroptosis**

Producida por infecciones de las especies *Salmonella* y *Sishigella* a través de un proceso pro-inflamatorio dependiente únicamente de caspasa 1. Esta caspasa al igual que la caspasa 3, procesa una serie de sustratos tales como IL-1 $\beta$  y IL-18, que a diferencia de la apoptosis expresan respuestas inflamatorias. El método por el cual se puede evaluar este tipo de muerte es a través de la determinación de la activación de la caspasa 1 (Raupach, *et al.* 2006; Fink y Cookson, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. General:**

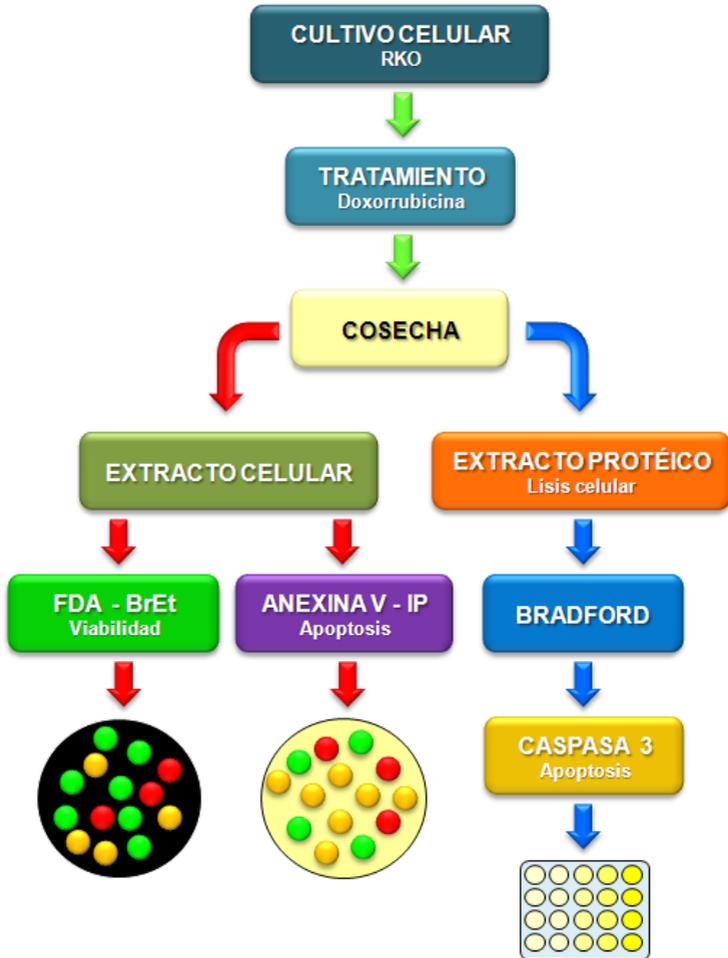
- Implementar dos diferentes ensayos que permitan la determinación de muerte celular por apoptosis en la línea celular RKO, expuestas durante 24 h a diferentes dosis de Doxorubicina.

### **2.2. Específicos:**

- Desarrollar curvas Dosis/Respuesta para establecer las dosis a probar de Doxorubicina mediante el ensayo de viabilidad por captación de: FDA-BrEt.
- Mediante el ensayo de Anexina V, determinar el índice de células en apoptosis en respuesta a las dosis de Doxorubicina establecidas.
- Determinar la actividad de caspasa 3 mediante el ensayo “CaspACE™ Assay System, Colorimetric” en respuesta a las dosis de Doxorubicina establecidas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Esquema del Proceso



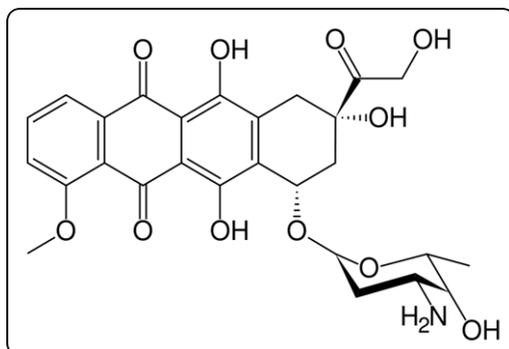
Fuente: Autor

### 3.2. Cultivo celular

Las líneas celulares tumorales son una herramienta esencial para diversas áreas de investigación biomédica (Berglind H, *et al.* 2008). El modelo celular que decidimos utilizar es RKO, las cuales provienen de carcinoma de colon y presentan p53 normal. Estas fueron donadas por la Dra. Patricia Ostrosky del Instituto de Biomédicas de la UNAM. La línea celular fue cultivada en medio Dulbecco's (GIBCO), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio 1 mM, antibiótico-antimicótico (Penicilina G sodio 100 UI/mL, Estreptomicina sulfato 100 µg/mL y Anfotericina B 0,25 µg/mL), L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales al 1 % (GIBCO). Mantenidas en incubadora a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosfera húmeda.

### 3.3. Tratamiento: Doxorrubicina

Para inducir apoptosis en la línea celular RKO se decidió utilizar como agente la Doxorrubicina (Dxo). La Dxo (Fig. 9) es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en el campo de la investigación. Aislado de la bacteria *Streptomyces peucetius*, la Dxo es un antibiótico citotóxico perteneciente al grupo de las antraciclinas. Es usada para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres en los que destacan leucemias, linfomas y sobre ciertos tumores sólidos como el de mama (Brunton, *et al.* 2007).



Fuente: FDA, 2003

Figura 9. Molécula de la Doxorrubicina

El mecanismo de acción corresponde a la inhibición de la actividad de la Topoisomerasa II, intercalándose en la cadena de ADN impidiendo por lo tanto la replicación y conduciendo a la célula hacia la muerte (Shad, *et al.* 2007; FDA, 2003). La Dxo resulta ser útil para la determinación de muerte por apoptosis, ya que este antineoplásico mediante daño directo al ADN es capaz de activar vía intrínseca de este tipo de muerte (Simonsikova, *et al.* 2008).

### **3.4. Viabilidad Celular por captación de FDA-BrEt**

Para el ensayo se empleó el protocolo descrito por Jones y Senft (1985), en donde se utilizan los fluorocromos FDA (Fluoresceín Diacetato) y BrEt (Bromuro de Etidio). El FDA fácilmente puede atravesar a la membrana citoplasmática; una vez dentro, las esterases producidas por la célula hidrolizan éste compuesto a Fluoresceína, de tal manera que a través de radiación emite una fluorescencia verde, identificando así a las células vivas.

Se sembró 50000 células/mL en un multiplato de 24 pocillos y se incubó durante 24 h. transcurrido el tiempo, cambiamos el medio y adicionamos la Dxo (SIGMA) a concentraciones finales de 0,5; 1; 2,5 y 5  $\mu$ M, además del control negativo en el cual se utilizó medio Dulbecco's suplementado, el mismo que sirvió para disolver la Dxo; incubar durante 24 h más. Posteriormente se obtuvo el extracto celular: El medio fue colectado en tubos de centrifuga, hicimos un lavado con PBS frío, luego con PBS-EDTA para despegar las células y un último lavado solo con PBS frío; los lavados también fueron colectados en los tubos. Centrifugamos durante 10 min a 1750 rpm, eliminamos el sobrenadante y lavamos el pellet con PBS frío para nuevamente centrifugar. El pellet fue mantenido en hielo.

Seguido, preparamos la solución de trabajo FDA-BrEt: 600  $\mu$ L de PBS, 25  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (SIGMA) 0,2 mg/mL y 3,75  $\mu$ L de Fluoresceín Diacetato (SIGMA) 5 mg/mL; se mezcló y se mantuvo en hielo. Tomamos 20  $\mu$ L de la solución de trabajo y resuspendimos en el pellet celular. Tomamos 20  $\mu$ L de la mezcla, colocamos en una placa portaobjetos y cubrimos con un cubreobjetos grande. Las placas fueron observadas en

microscopio de fluorescencia (ZEISS) con un filtro de 450 – 490 nm de excitación y 515 nm de emisión; en donde se contó alrededor de 200 células utilizando el objetivo de 40X.

Las células fluorescentes verdes fueron consideradas como vivas, las células fluorescentes rojas fueron consideradas como muertas y las células que presentaban fluorescencia amarilla o ambas fluorescencias fueron consideradas como células comprometidas en estado de agonía.

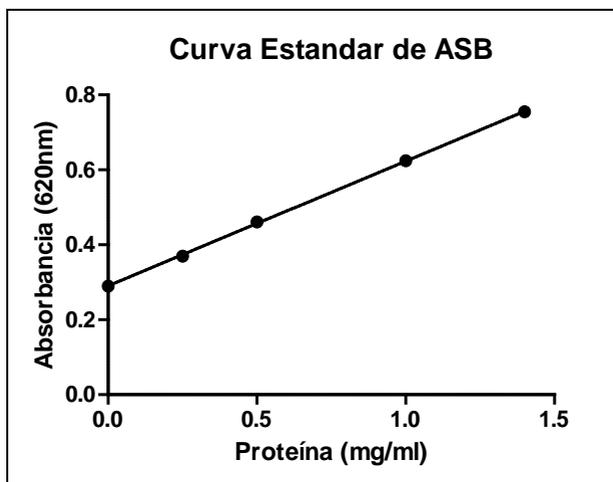
### **3.5. Actividad de Caspasas**

Para este ensayo empleamos el kit “CaspACE™ Assay System, Colorimetric” (Promega), el cual provee dos reactivos sintéticos: Ac-DEVD-pNA como el sustrato de la caspasa 3 y Z-VAD-FMK (*Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone*) como inhibidor de la actividad de dicha caspasa.

Sembramos 95000 células/mL en un multiplato de 12 pocillos e incubamos durante 24 h. Luego cambiamos el medio al cultivo para dar el respectivo tratamiento: adicionamos la Dxo en concentraciones finales de 0,5; 1 y 2,5  $\mu\text{M}$ ; incubamos durante 24 h más y posteriormente se obtuvo el extracto de células de la misma forma que en viabilidad. Para la obtención del extracto proteico, trasparamos el pellet obtenido a microtubos de 1,5 mL y adicionamos 60  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (proporcionado por el kit) se homogenizó con vortex y se incubó durante 15 min en hielo. Finalmente centrifugamos a 15000 rpm, recogimos el sobrenadante y lo almacenamos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En un segundo cultivo celular, además de la Dxo se adicionó el inhibidor Z-VAD-FMK a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  para cada tratamiento, incubamos por 24 h y luego obtuvimos de igual manera tanto el extracto celular como el extracto proteico.

Previo a la realización del ensayo de caspasas, se construyó una curva de calibración para establecer el volumen correcto del extracto proteico a utilizar, el cual tendría una concentración final de 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Para ello, se empleó la técnica de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como proteína patrón.

Se preparó cuatro estándares a diferentes concentraciones en un intervalo de 0,2 a 1,4 mg/mL de ASB (SIGMA). Luego, en un multiplato de 96 pocillos se mezcló los estándares y los extractos proteicos con el reactivo de Bradford (SIGMA) a una proporción de 1:30 en un volumen final de 150  $\mu$ L. Se incubó por 30 min para luego monitorear la absorbancia en un espectrofotómetro (Tecan) a una longitud de onda de 620 nm. La curva de calibración fue construida utilizando el software estadístico GraphPad, a través del cual se pudo obtener los volúmenes correctos del extracto proteico de los diferentes tratamientos con Dxo para emplearlos en el ensayo de caspasas (Grafico 1).



**Gráfica 1. Curva estándar** de calibración construida mediante la técnica de Bradford utilizando ASB como proteína patrón.  $R^2 = 0,9998$ .

La adición de los reactivos proporcionados por del kit (buffer de caspasas y Ac-DEVD-pNA), los necesarios para el ensayo (DMSO, DTT 100 mM) y de los extractos proteicos se hizo según las especificaciones del inserto en un multiplato de 96 pocillos a un volumen final de 200  $\mu$ L para cada muestra. Se incubó durante 4 h a 37  $^{\circ}$ C y su absorbancia fue monitoreada a 405 nm.

### **3.6. Externalización de la FS**

Sembramos 240000 células/mL en un multiplato de 6 pocillos e incubamos durante 24 h. Luego, cambiamos el medio y adicionamos la Dxo a concentraciones finales de 0,5; 1 y 2,5  $\mu$ M; se incubó durante 24 h más y posteriormente obtuvimos el extracto celular: Se colectó el medio en tubos de centrifuga y se lavó con PBS, las células fueron despegadas utilizando un raspador. Tanto las células como los lavados también fueron colectados en los tubos. Luego se centrifugó y se lavó el pellet de nuevo con PBS frío. Finalmente se volvió a centrifugar para quedarnos con el pellet.

Preparamos la solución de trabajo: 20  $\mu$ L de Anexina V (Roche), 20  $\mu$ L de Ioduro de Propidio 50  $\mu$ g/mL (SIGMA) y 960  $\mu$ L de Buffer de HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM y  $\text{CaCl}_2$  5 mM). Añadimos 50  $\mu$ L de la solución de trabajo al pellet y dejamos incubar por 15 min a temperatura ambiente y después se mantuvo en hielo. Tomamos 20  $\mu$ L de la mezcla, colocamos en una placa portaobjetos y cubrimos con un cubreobjetos grande. Luego procedimos a contar alrededor de 200 células utilizando el microscopio de fluorescencia en las mismas condiciones que en viabilidad.

Las células fluorescentes verdes fueron consideradas como apoptóticas, las células fluorescentes rojas fueron consideradas como muertas y las células incoloras, vistas con luz normal fueron consideradas como vivas.

### **3.7. Análisis Estadístico**

Cada experimento fue realizado por duplicado en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, a través del software estadístico GraphPad, utilizando la prueba de rango múltiple de Dunnet para comparar los resultados entre los diferentes tratamientos de Dxo y el control negativo; y la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar entre los tratamientos si lo requiere.

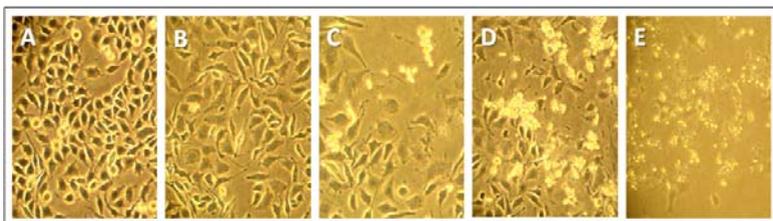
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La apoptosis es un tipo de muerte silenciosa, que no produce inflamación y que no afecta al resto del tejido; debido a ello, la activación de esta vía de muerte en células tumorales resulta ser una de las mejores estrategias para el tratamiento del cáncer (Ashkenazi, 2008). La Doxorrubicina forma parte de un amplio grupo de antineoplásicos, pero su administración se ve limitada debido a su elevada toxicidad; sin embargo, en el presente trabajo, nos permitió implementar dos biomarcadores para la detección de apoptosis ya que este antineoplásico es capaz de activar esta vía de muerte.

Los métodos para identificar compuestos capaces de inducir apoptosis han ido evolucionando desde el siglo XIX (Elmore, 2007). En la etapa de decisión y ejecución de esta vía de muerte se activan una serie de reacciones bioquímicas genéticamente controladas, produciendo cambios morfológicos y fisiológicos sobre las células (Taylor, *et al.* 2008; Blankenberg, 2008; Gewies, 2003); los cuales pueden ser detectados mediante el uso de biomarcadores para identificar a las principales biomoléculas responsables de estas reacciones (Cummings, *et al.* 2008). En el presente trabajo, hemos decidido implementar en el Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) de la UTPL, dos de estos biomarcadores apoptóticos: la *Anexina V* y la actividad de *Caspasas*; para ello, se realizó un ensayo previo de viabilidad utilizando la Dxo.

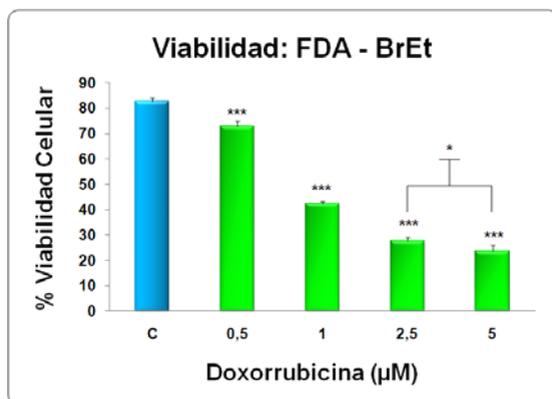
### 4.1. Viabilidad Celular por captación de FDA-BrEt

Para establecer las concentraciones a las cuales la Dxo produce más del 50% de muerte celular empleamos el ensayo de viabilidad por captación de FDA y BrEt, mediante al cual evaluamos el porcentaje de células vivas, muertas y en agonía; de este modo este ensayo nos asegura que alguna de las vías de muerte ha sido activada. Las concentraciones de Dxo probadas fueron de: 0,5; 1; 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ , durante un tiempo de exposición de 24 h; las cuales originaron notables cambios morfológicos sobre la línea celular RKO, principalmente en las dos últimas concentraciones (Foto 3).



Fuente: Autor

**Foto 3. Línea celular RKO** luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de Dxo. A) Control negativo. B) 0,5 µM. C) 1 µM. D) 2,5 µM. E) 5 µM. Vistan en microscopio invertido de contraste de fases con objetivo de 20 X.



**Gráfica 2. Porcentaje de células viables** expuestas a cuatro diferentes concentraciones de doxorubicina durante 24 h. Dunnet: \*\*\* =  $P < 0,0001$ . Tukey: \* =  $P < 0,05$ .

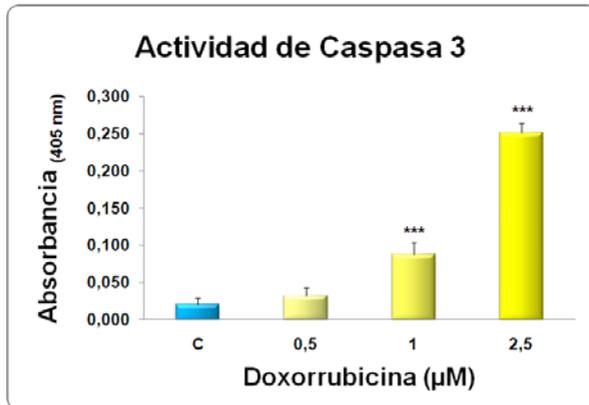
En la gráfica 2 podemos observar una respuesta dosis-dependiente hasta la concentración de 2,5 µM, y que la viabilidad celular se reduce considerablemente en un 42,42 % en la concentración de 1 µM. Mediante la prueba de rango múltiple de Dunnet, se determinó que existe una diferencia significativa entre el control y las cuatro concentraciones de Dxo empleadas. Además, también se puede observar que entre las dos últimas concentraciones (2,5 y 5 µM) existe una diferencia del 4 % aproximadamente, la cual mediante la prueba de Tukey, se demuestra que si existe una diferencia significativa, pero su P es menor a 0,05.

Entre las técnicas utilizadas para determinar viabilidad celular está el ensayo de MTT, una prueba colorimétrica que se basa en el metabolismo de la célula. Smukste *et al* (2006) utilizando este ensayo, determinó que luego de 24 h de exposición a 1  $\mu\text{M}$  de Dxo la viabilidad de la línea celular C-26 (también de carcinoma de colon) disminuía aproximadamente en un 40 %. La Eficiencia en Placa es otro ensayo que también mide viabilidad, el cual consiste en la cuantificación de colonias formadas por clones celulares sometidas a un previo tratamiento. Han *et al* (1997) determinó mediante este ensayo que después de 24 h de exposición a 0,1  $\mu\text{M}$  de Dxo, la viabilidad de la línea celular Rat-1 (fibroblastos de rata) disminuía en un 90 %. Ambos datos demuestran que la susceptibilidad a la Dxo va a depender del modelo biológico empleado. En nuestro caso, el resultado obtenido es similar al publicado por Smukste, probablemente porque ambas líneas celulares son derivadas de cáncer de colon humano.

Una vez analizados los resultados de viabilidad celular, en donde dependiendo de la concentración de Dxo se observó un incremento del porcentaje de células muertas y que además se mantuvo un número considerable de células vivas; se consideró que 0,5; 1 y 2,5  $\mu\text{M}$  de Dxo son las concentraciones más adecuadas para proceder a la determinación de apoptosis mediante los ensayos de: activación de Caspasas para determinar la actividad proteolítica de la caspasa 3 y el de Anexina V para determinar el índice de células apoptóticas a través de la externalización de la FS.

#### **4.2. Actividad de Caspasas**

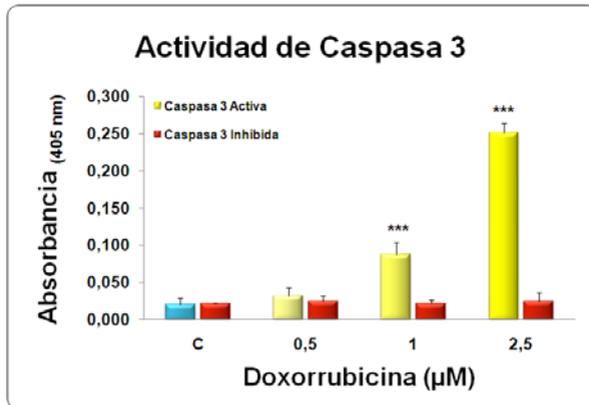
La demolición celular a través de la proteólisis de las diferentes proteínas que mantiene la integridad y funcionalidad de la célula es llevada a cabo por las caspasas efectoras, principalmente por la caspasa 3, luego de ser activada como resultado final de las dos vías de la apoptosis. De este modo, se decidió determinar la activación de la caspasa 3 utilizando un kit colorimétrico.



**Gráfica 3. Actividad de caspasa 3** en la línea celular RKO expuestas a Dxo durante 24 h. Dunnet: \*\*\* =  $P < 0,0001$ .

En la gráfica 3, podemos observar que a medida que incrementa la concentración de Dxo también incrementa la actividad de la caspasa 3, sobre todo en la concentración más alta. Además, mediante la prueba de Dunnet se pudo determinar que a concentraciones de 1 y 2,5  $\mu\text{M}$  existen diferencias significativas con respecto al control, al contrario de lo que ocurre entre la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ , el cual no expresa ninguna diferencia significativa.

El sustrato Ac-DEVD-pNA utilizado en este ensayo no es específico para caspasa 3, ya que también puede ser clivado por la caspasa 7 (Cohen, 1997) e incluso por las caspasas 1, 4 y 6 (Talanian, 1997) pero en menor capacidad. Es por ello que para garantizar la fiabilidad del método empleado se utilizó el compuesto Z-VAD-FMK, un inhibidor de la caspasa 3. En el control negativo de la gráfica 4, podemos observar que la absorbancia proporcionada con la caspasa 3 inhibida es similar que cuando la caspasa 3 está activa; además se observa que aunque la concentración de Dxo va incrementando la absorbancia con caspasa 3 inhibida se mantiene. De esta manera podemos determinar que las absorbancias obtenidas en los tres tratamientos son proporcionadas exclusivamente por acción de la caspasa 3.



**Gráfica 4. Inhibición de caspasa 3**, en la línea celular RKO expuestas a Dxo durante 24 h. Dunnet: \*\*\* =  $P < 0,0001$ .

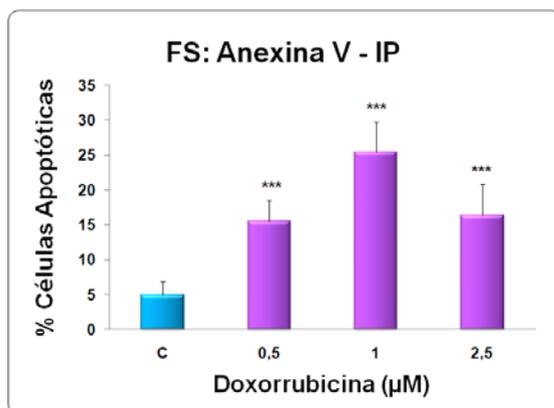
Aunque en general se podría utilizar este biomarcador para establecer si existe una respuesta apoptótica, es importante el modelo biológico, ya que en aquellas líneas celulares como la MCF-7 (cáncer de mama), a diferencia de la RKO, carecen de caspasa 3 debido a una mutación a nivel del gen que la expresa. En su lugar, se encuentra la caspasa 7; sin embargo, los niveles de actividad de esta caspasa son relativamente inferiores con respecto a la caspasa 3 (Yang, *et al.* 2001; Kagawa, *et al.* 2001).

Uno de los agentes que induce apoptosis por daño directo al ADN es la radiación, la cual es utilizada para el tratamiento del cáncer a través de un método conocido como radioterapia; sin embargo su aplicación, al igual que la quimioterapia puede causar daños severos sobre el genoma (Sisaia y Creasman, 2002). Utilizando el mismo biomarcador, Tong, *et al.* (2000), en la determinación de la actividad de caspasa 3 sobre la línea celular U-937 (cáncer leucémico), obtuvo una absorbancia de 0,250 nm aproximadamente, 1 h después de haber recibido una dosis de 20 Gy/min de radiación; absorbancia similar a la obtenida en nuestro estudio utilizando una concentración de 2,5 µM de Dxo. Pese a que la Dxo también causa daño directo al ADN, el mecanismo de acción es diferente (Brunton, *et al.* 2007), razón por la cual el tiempo de activación de la apoptosis varía.

Para expresar las unidades de actividad específica de caspasa 3 se puede emplear fórmulas y curvas de calibración. De tal manera que nuestros resultados podrían ser aun más comparativos con otros trabajos; sin embargo, nuestra gráfica claramente nos muestra que existe una respuesta apoptótica en donde podríamos determinar que a dosis de 2,5  $\mu\text{M}$  tenemos un incremento considerable de actividad de la caspasa 3.

### 4.3. Externalización de la FS

El empleo de Anexina V-FLUOS sobre la línea celular RKO tratadas con Dxo y utilizando un buffer que contenía  $\text{Ca}^{2+}$ , permitió determinar mediante microscopía de fluorescencia el índice o el porcentaje de las células en proceso apoptótico. Para obtener estos resultados también se puede emplear un citómetro de flujo, pero debido a las condiciones del CBCM, no es posible realizar este ensayo con mencionado equipo. Sin embargo los resultados obtenidos no varían, ya que de igual forma se puede obtener tanto el índice de células vivas, muertas y apoptóticas; ya que ambos equipos se basan en el mismo principio.



**Gráfica 5. Porcentaje de células apoptóticas**, expuestas durante 24 h a Dxo a diferentes concentraciones. Dunnet: \*\*\* =  $P < 0,0001$ .

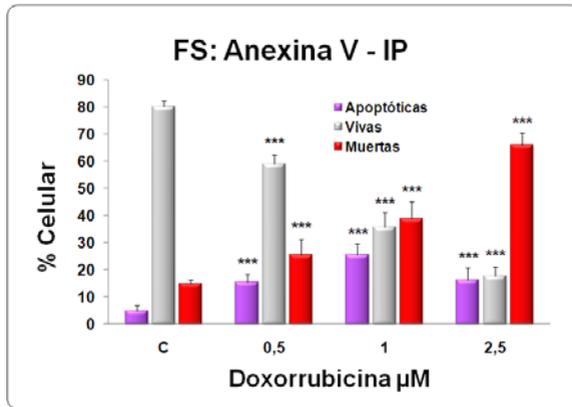
En la gráfica 5, se observa un aumento del porcentaje de células apoptóticas en todas las concentraciones de Dxo luego de 24 h de exposición. Mediante la prueba de Dunnet se

determinó que existe diferencia significativa en las tres concentraciones aplicadas con respecto al control negativo, aunque el porcentaje de células apoptóticas es mayor en 1  $\mu\text{M}$  que con 2,5  $\mu\text{M}$ .

Thompson, *et al.* (2004), utilizando la Anexina V como biomarcador a través de citometría de flujo y el mismo modelo biológico, determinó que luego de 48 h de exposición a 0,5  $\mu\text{M}$  de Dxo el porcentaje de células en apoptosis incrementa en un 90 % aproximadamente. Los tiempos prolongados de exposición a este antineoplásico a concentraciones elevadas puede matar por completo a las células por apoptosis (Foto 1; E); sin embargo, las concentraciones bajas podrían mantener en un inicio a las células en un estado senescente seguido de apoptosis (Eom, *et al.* 2005). Es por ello que en nuestro estudio, a concentraciones de 2,5  $\mu\text{M}$  podemos encontrar más células en un estado necrótico más que apoptótico.

En el organismo, las células que se encuentran en apoptosis son rápidamente fagocitadas para evitar respuestas inmunes. En cambio, en ensayos realizados *in vitro*, las células no pueden ser fagocitadas por la ausencia de macrófagos; de tal manera que la poca estabilidad que posee la membrana citoplasmática de las células apoptóticas se pierde por completo; dando como resultado un fenómeno conocido como “*pinching off*” en donde las células terminan su proceso de muerte por el estallido de los cuerpos apoptóticos (Taylor, *et al.* 2008).

Por otro lado, el hecho de que la muerte celular se halla iniciado en apoptosis no implica que termine como tal. Se han demostrado varios estudios en donde se confirma que todas las vías de muerte están entrelazadas entre sí; por ejemplo, si la muerte se inicia por apoptosis esta puede terminar en una necrosis (Fink y Cookson, 2005). Este hecho se confirma ya que en este ensayo también se empleó IP, el cual nos permitió identificar así mismo el porcentaje de las células en apoptosis tardía y/o necrosis temprana, ya que en ellas el IP interacciona con el ADN de las células que se encuentran con la membrana plasmática fragmentada.

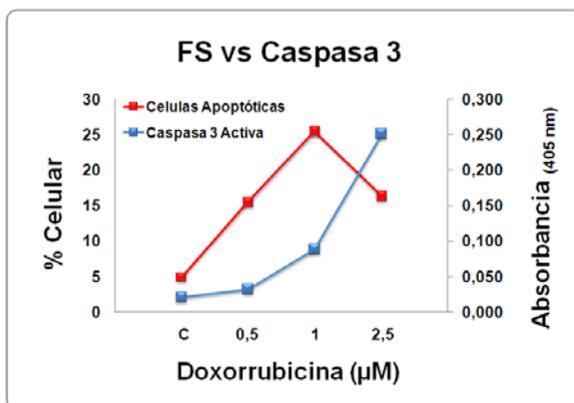


**Gráfica 6. Porcentaje de células apoptóticas, vivas y muertas;** luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de Dxo. Dunnet: \*\*\* =  $P < 0,0001$ .

En la Gráfica 6 tenemos el porcentaje de las células apoptóticas, vivas y otros tipos de muerte en el que incluye la necrosis. Según la prueba de Dunnet todas las concentraciones aplicadas de Dxo representan una diferencia significativa con respecto al control. Además, podemos observar que según incrementa la concentración el porcentaje de células vivas disminuye, mientras que el porcentaje de células muertas aumenta.

Por último, en la gráfica 7, en una comparación entre el porcentaje de células en apoptosis y la activación de caspasa 3 podemos observar como la actividad de ambos eventos incrementan según aumenta la concentración de Dxo hasta 1 µM, mientras que en la concentración de 2,5 µM se puede observar que el índice de células en apoptosis es más bajo con respecto a las caspasa 3 activa. Este hecho puede ocurrir debido a que la vía de muerte apoptótica no es estática y el proceso bioquímico sigue su curso, activándose en diferente tiempo los distintos marcadores. Es así, que a pesar de que las células entren en apoptosis tardía, la actividad de la caspasa 3 todavía no decrece y dependiendo de las condiciones dicha caspasa probablemente puede seguir clivando a sus sustratos o inactivarse totalmente por degradación. En nuestro estudio, la caspasa 3 aún se mantiene activa, es por ello que a concentraciones de 2,5 µM, aunque disminuye el índice de

células apoptóticas mediante en ensayo de Anexina V, también se puede identificar una respuesta apoptótica a través del ensayo de caspasas.



**Grafica 7. Comparación entre el porcentaje de células apoptóticas y la activación de caspasa 3; ambas como respuestas apoptóticas.**

Finalmente, el ensayo de Caspasas y el de externalización de la FS presentaron los resultados que esperábamos. La línea celular RKO respondió al estímulo citotóxico de la Dxo a través de apoptosis luego de 24 h de exposición; sin embargo, dichas respuesta fueron dependientes de la concentración aplicada. De este modo, ambos ensayos que permiten detectar actividad apoptótica quedan implementados en el CBCM, los cuales aportarán en la identificación de compuestos con actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas, e incluso identificar el tipo de muerte que inducen sobre éstas, los cuales podrían servir como fármacos antineoplásicos.

## 5. CONCLUSIONES

La aplicación de 1  $\mu\text{M}$  de Dxo sobre la línea celular tumoral RKO, es una adecuada concentración referencial para ser aplicados en ensayos tanto de viabilidad como de inducción de apoptosis.

Para determinar el tipo de muerte que induce un compuesto citotóxico es importante escoger adecuadamente el modelo biológico, el biomarcador a emplear, así como el tiempo en cual se hace la cuantificación.

En el caso de los dos ensayos empleados en este trabajo, la actividad de la Caspasa 3 y de anexina-V, son biomarcadores para la determinación de apoptosis; sin embargo, independientemente ambos miden características distintas del proceso, razón por la cual no se puede observar la misma respuesta biológica al mismo tiempo de exposición y a la misma concentración, sin que esto signifique que existe una contradicción entre ellos. Ambos biomarcadores son igual de útiles y complementarios entre sí.

## 6. BIBLIOGRAFÍA:

1. ACS. American Cancer Society. Junio 2009. Cancer Facts & Figures 2008. Mayo de 2009.  
<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>.
2. ALSA. Amyotrophic Lateral Sclerosis Association. Cell Death and Apoptosis. Mayo de 2009.  
<http://www.alsa.org/research/article.cfm?id=821>
3. Amelio M., Tino E., Cecconi F. 2007. The Apoptosome: Emerging Insights and New Potential Targets for Drug Design. *Pharmaceutical Research*. 25: 740-751.
4. Andree H., Reutelingsperger C., Hauptmann R., Hemker H., Hermens W., Willems G. 1990. Binding of Vascular Anticoagulant  $\alpha$  (VAC  $\alpha$ ) to Planar Phospholipid Bilayers. *The Journal of Biological Chemistry*. 9: 4920-4928.
5. Ashkenazi A. 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonist. *Nature*. 7: 1001-1012.
6. Balasubramanian K., Schroit A. 2003. Aminophospholipid Asymmetry: A Matter of Life and Death. *Annual Review Physiology*. 65: 701-34.
7. Berglind H, Pawitan Y., Kato S., Ishioka C., Soussi T. 2008. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines. *Cancer Biology and Therapy*. 7 (5): 699-708.
8. Bivén K., Erdal H., Hägg M., Ueno T., Zhou R., Lynch M., Rowley B., Wood J., Zhang C., Toi M., Shoshan M., Linder S. 2003. A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and monitoring apoptosis in patient sera. *Apoptosis*. 8: 263-268.
9. Blankenberg F. 2008. In Vivo Detection of Apoptosis. *The Journal of Nuclear Medicine*. 49: 81-95.
10. Brunton L., Lazo J., Parker K. 2007. Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición. McGraw-Hill. New York.
11. Chipuk J., Green D., 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 13: 994-1002.
12. Cohen G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem*. 326: 1-16.
13. Cummings J., Ward T., Greystoke A., Ranson M., Dive C. Biomarker method validation in anticancer drug

- development. *British Journal of Pharmacology*. 153: 646-656.
14. Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Hong Z. 2008. Analysis of apoptosis by Cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 44: 250-254.
  15. Debatin K. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 53: 153-159.
  16. Dey A., Tergaonkar V., Lane D., 2008. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature*. 7: 1031-1040.
  17. Disaia P., Creasman W. 2002. *Oncología Ginecología Clínica*. Sexta Edición. Madrid.
  18. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35 (4): 495-516.
  19. Eom Y., Kim M., Park S., Goo M., Kwon H., Sohn S., Kim W. Yoon G., Choi K. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogen*. 24: 4765-4777.
  20. FDA. Food and Drug Administration. Mayo 2009. Doxorubicin.  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfm?ID=223>.
  21. Ferri K., Kroemer G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*. 3: 255-263.
  22. Fink S., Cookson B. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 73: 1907-1916.
  23. FotCiencia. Certamen nacional de Fotografía Científica. Mayo de 2009.  
<http://www.fotciencia.fecyt.es/premiados.aspx>
  24. Gewies A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*. 1: 1-26.
  25. Han J., Dionne C., Kedersha N., Goldmacher V. 1997. p53 Status Affects the Rate of the Onset but not the overall extent of Doxorubicin-induced Cell Death in Rat-1 Fibroblasts Constitutively Expressing c-Myc. *Cancer Research*. 57: 176-182.
  26. Hicks S., Machamer C. 2005. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744: 406-414.

27. Jones K., Senft J. 1985. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 33: 77-79.
28. Jordan L., Harrison D., 2003. Apoptosis and Cell Senescence. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Second edition. Wiley. New York.
29. Ju J., Schmitz J., Song B., Kudo K., Chu E. 2007. Regulation of p53 Expression in Response to 5-Fluorouracil in Human Cancer RKO Cells. *Clinic Cancer Research*. 13 (14): 4245-4251.
30. Kaufmann S., Lee S., Meng X., Loegering D., Kottke T., Henzing A., Ruchaud S., Samejima K., Earnshaw W. 2007. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 44: 226-272.
31. Kiss L., Szabó C. 2005. The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100 (1): 29-37.
32. Krysko D., Berghe T., D'Herde K., Vandenabeele P. 2008. Apoptosis an necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44: 205-221.
33. LaCasse E., Baird S., Korneluk R., MacKenzie A. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 17: 3247-3259.
34. Laufer E., Reutelingsperger C., Narula J., Hofstra L. 2008. Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk. *Basic Research Cardiology*. 103: 95-104.
35. Lessene G., Czabotar P., Colman P. 2008. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Reviews*. 7: 989-1000.
36. Li Z., Hu D., Chu Q., Wu J., Gao C., Zhang Y., Huang Y. 2004. Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization. *World Journal of Gastroenterology*. 10 (13): 1876-1880.
37. Liva D., Muñoz J., Quesada R., Almodóvar M., Oliver F. 2006. Poli (ADP-Ribosa) polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer. *Médicas UIS*. 19: 95-103.
38. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L., Darnell J., 2005. *Biología Celular y*

- Molecular. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
39. Martinou J., Desagher S., Antonsson B. 2000. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nature Cell Biology*. 2: 41-43.
  40. Mehlen P., Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature*. 6: 449-458.
  41. Muñoz J., Martín D., Aguilar R., Cañuelo A., Nuñez M. Valenzuela M. Almodóvar J. Murcia G., Oliver F. 2005. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochemical Society*. 386: 119-125.
  42. Nachimias B., Ashhab Y., Ben-Yehuda D. 2004. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 231-243.
  43. Nagane M., Huang H., Cavenee W. 2001. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis*. 6: 191-197.
  44. Nitiss J. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature*. 19: 338-350.
  45. O'Valle F., Benítez M., Oliva M., Del Moral R., Morales M., Godoy C., Del Moral F., Aguilar M., Oliver F., Del Moral R. 2006. La sobreexpresión de poli (ADP-ribosa) polimerasa se correlaciona con el desarrollo de necrosis tubular aguda y con la función precoz del trasplante renal. *Revista Española de Patología*. 39: 235-241.
  46. Offer H., Erez N., Zurer I., Tang X., Milyavsky M., Goldfinger., Rotter V. 2002. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*. 23: 1025-1032.
  47. Okada H., Mak T. 2004. Pathways of Apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews*. 4: 592-603.
  48. Philchenkov A. 2006. Apoptosis, cancer, and beyond. *Cell Death and Differentiation*. 13: 2004-2005.
  49. Promega. Junio de 2009. Protocols & Applications Guide: Apoptosis. <http://www.promega.com/paguide/chap3.htm>
  50. Rashmi R., Pillai S., Vijayalingam S., Ryerse J., Chinnadurai G. 2008. BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in *Bcl-2* null cells. *Oncogen*. 27: 1366-1375.

51. Raupach B., Peuschel S., Monack D., Zychlinsky. 2006. Caspase-1-Mediated Activation of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 Contributes to innate Immune Defenses against *Sallmonella entérica* Serovar Typhimurium Infectio. *Infection and Immunity*. 74 (8): 4922-4926.
52. Reed J., Pellecchia M. 2005. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 106: 408-418.
53. Ryang D., Joo Y., Chung K., Lim S., Jeong H., Kim H., Lee W., Park C., Kim H., Choi S., Rew J., Lee J., Park C. 2007. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 22: 263-269.
54. Sak A., Wurm R., Elo B., Grehl S., Pöttgen C., Stüben G., Sinn B., Wolf G., Budach V., Stuschke M. 2003. Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Cancer Gene Therapy*. 10: 926-934.
55. Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition. New York.
56. Schinoni M., Parana R. 2006. Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 36: 211-217.
57. Schlegel R., Williamson P. 2007. P.S. to PS (Phosphatidylserine)-Pertinent Proteíns in Apoptotic Cell Clearance. *Science STKE*. 408: 1-3.
58. Shad K., Al-Salam S., Hamza A. 2007. Sesame Oil as a Protective Agent Against Doxorubicin Induced Cardio Toxicity in Rat. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2 (4): 159-163.
59. Simoncikova P., Ravingerová T., Barancik M. 2008. The Effect of chronic Doxorubicin treatment on Mitige-Activated Protein Kinases and Heat Stress Proteins in Rat Hearts. *Physiology Research*. 57: 97-102.
60. Sinha R., El-Bayoumy K., 2004. Apoptosis is a Critical Cellular Event in Cancer Chemoprevention and Chemotherapy by Selenium Compounds. *Current Cancer Drug Targets*. 4: 13-28.
61. Smukste I., Bhalala O., Persico M., Stockwell B. 2006. Using small molecules to overcome drug resistance induced by a viral oncogene. *Cancer Cell*. 9: 133-146.
62. Sreedhar A., Csermely P. 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A

- comprehensive review. *Pharmacology and therapeutics*. 11: 227-257.
63. Talanian R., Quinlan C., Trautz S., Hackett M., Mankovich J., Banach D., Ghayur T., Brady K., Wong W. 1997. Substrate Specificities of Caspase Family Proteases. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 9677-9682.
  64. Taylor R., Cullen S., Martin S. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*. 9: 231-241.
  65. Taylor R., Cullen S., Martin S. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews*. 9: 231-241.
  66. Thompson T., Tovar C., Yang H., Carvajal D., Vu B., Xu Q., Wahl G., Heimbrook D., Vassilev L. Phosphorylation of p53 on Key Serines Is Dispensable for transcriptional Activation and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 53015-53022.
  67. Thornberry N., Bull H., Calaycay J., Chapman K., Howard A., Kostura M., Miller D., Molineaux S., Weidner J., Aunis J., Elliston K., Ayala J., Casano F., Chin J., Ding G., Egger L., Gaffney E., Limjuco G., Palyha O., Raju S., Rolando A., Salley J., Yaming T., Lee T., Shively J., MacCross M., Mumford R., Schmidt J., Tocci M. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature*. 356: 768-774.
  68. Thornberry N., Bull H., Calaycay J., Chapman K., Howard A., Kostura M., Miller D., Molineaux S., Weidner J., Aunins J., Elliston K., Ayala J., Cassano F., Chin J., Ding G., Egger L., Gaffney E., Limjuco G., Oksana P., Raju S., Rolando A., Salley J., Yamin T., Lee T., Shively J., MacCross M., Mumford R., Schmidt J., Tocci M. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature*. 356: 768-774.
  69. Tong X., Liu B., Dong Y., Sun Z. Cleavage of ATM during radiation-induced apoptosis: caspase-3-like apoptotic protease as a candidate. *International Journal of Radiation Biology*. 76 (10): 1387-1395.
  70. Tsao A., Kim E., Hong W. 2004. Chemoprevention of Cancer. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 54: 150-180.
  71. Westernmeier R. 2001. *Electrophoresis in Practice*. Third Edition. Wiley-VCH. Weinheim.
  72. WHO, World Health Organisation. Junio de 2009. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>.

73. Yang X., Sladek T., Liu X., Butler B., Froelich C., Thor A. 2001. Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer to Doxorubicin- and Etoposide-induced Apoptosis. *Cancer Research*. 61: 348-354.
74. Zhivotovsky B., Samali A., Orrenius S. 1999. Determination of Apoptosis and Necrosis. *Current Protocols in Toxicology*. First Edition. New York.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Abreviaturas: Significado - Español

- **Apaf-1:** Apoptosis protease-activating factor-1 - Factor 1 activador de proteínas Apoptóticas
- **Bcl-2:** B-cell lymphoma 2 - Linfoma 2 de células B.
- **BrdUTP:** Bromodeoxyuridine triphosphate - Bromodeoxiuridina Trifosfato.
- **CADs:** Caspase activated DNases - DNasas dependientes de caspasas.
- **CDKs:** Cyclin-dependent kinases - Quinasas Dependientes de Ciclinas
- **c-FLIP:** Cellular-FLICE inhibitory protein - Proteína inhibidora de FLICE celular.
- **FADD:** Fas activating death domain - Fas asociado a dominios de muerte.
- **FasL:** Fas ligand - Fas ligando.
- **IAPs:** Inhibitor of apoptosis proteins - Proteínas inhibidoras de la Apoptosis.
- **PARP:** Poly ADP ribose polymerase - Poli ADP Ribosa Polimerasa.
- **Smac/DIABLO:** Second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI - Segundo activador derivado de la mitocondria / proteínas de anclaje directo a IAPs de bajo PI.
- **TdT:** Terminal Deoxynucleotidyl transferase - Deoxinucleotidil transferasa terminal.
- **TNF:** Tumor Necrosis Factor - Factor de Necrosis Tumoral
- **TRADD:** TNF-R1 associated death domain - TNF asociado a dominios de muerte.
- **TRAIL:** TNF-related apoptosis inducing ligand - Apoptosis Inducida por Ligandos Relacionados a TNF
- **TUNEL:** Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling - Rotura terminar anclada a dUTP por transferasas.
- **VAC $\alpha$ :** Vascular anticoagulant  $\alpha$  - Anticoagulante vascular  $\alpha$ .