

35



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DE LAS PROTEINAS DE LA FAMILIA DE Bcl-2 EN LA INHIBICION CON DEXAMETASONA DEL PROCESO APOPTOTICO POR CISPLATINO EN CELULAS HeLa.

290757

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DE LOS ANGELES CANCINO RODEZNO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



EREGAD NACIONAL  
AVIUMA DE  
MEZIC

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en la inhibición con Dexametasona del proceso apoptótico por cisplatino en células HeLa.

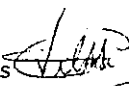
realizado por María de los Angeles Cancino Rodezno.


con número de cuenta 9231761-7 , pasante de la carrera de Biología


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

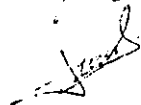
Director de Tesis

Propietario Dra. Vilma Maldonado Lagunas 

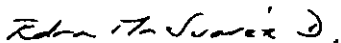
Propietario Dr. Jorge Meléndez Zajgla 

Propietario Biól. Miguel Angel Palomino Garibay 

Suplente Biól. Julio Alejandro Prieto Sagredo 

Suplente Dra. Lourdes Segura Valdez 

Consejo Departamental de Biología.



Dra. Edna María Suárez Díaz.

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS.

A mi Tío Miguel Angel Cancino Osorio por ser el ejemplo mas edificante en mi vida.

A mi familia por todos los años que hemos estado juntos.

A los Doctores Vilma Maldonado y Jorge Meléndez por ser excelentes directores de tesis, por sus enseñanzas, y por su apoyo.

A los miembros de mi comité de examen por su tiempo, sus consejos y sus valiosas asesorías para que este trabajo pudiera ser realizado:

Dra. Vilma Maldonado Lagunas.

Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

Biól. Miguel Angel Palomino Garibay.

Biól. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

Dra. Lourdes Segura Valdez.

De manera particular agradezco al Profesor Julio Prieto por su ayuda para realizar las pruebas estadísticas en este trabajo de tesis.

Al laboratorio M&M´s integrado por Floria, Esther y Magali por enriquecer este trabajo con sus conocimientos y críticas casi siempre constructivas, además de enriquecer mi ánimo con su amistad.

De una manera muy especial a la Maestra Bandala por la dedicación que me tuvo, su ayuda invaluable y sobre todo por su paciencia.

A todos los profesores que trabajaron en mi educación.

Agradezco a los profesores de la Facultad de Ciencias por contribuir en mi formación académica.

A mis amigos: todas ellas y todos ellos ( que si especificara a quienes agradezco y que les agradezco me llevaría mas hojas que mi tesis como tal) por colaborar directa o indirectamente a finalizar mi carrera de Biología.

Gracias por ser y estar.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BASICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS.

*"Si tienes un título universitario, puedes estar seguro de una cosa...  
¡Qué tienes un título universitario!"*

Anónimo.

## INDICE.

♦ <b>ABREVIATURAS.</b>	1
♦ <b>RESUMEN.</b>	1
♦ <b>INTRODUCCION.</b>	1
APOPTOSIS.	1
Apoptosis vs Necrosis.	1
Genes involucrados en la apoptosis.	2
FAMILIA BCL-2.	3
Dimerización.	3
Dominios conservados de homología Bcl-2 (BH).	4
Bcl-2 y mitocondria.	5
VIAS DE SEÑALIZACION APOPTOTICA.	5
CISPLATINO.	6
Mecanismo de acción.	6
Cisplatino y apoptosis.	7
CELULAS HeLa.	7
GLUCOCORTICOIDES.	7
Mecanismo de acción.	8
Dexametasona.	8
♦ <b>ANTECEDENTES.</b>	9
♦ <b>JUSTIFICACION.</b>	10
♦ <b>HIPOTESIS.</b>	11
♦ <b>OBJETIVOS.</b>	12
Generales.	12
Específicos.	12
♦ <b>MATERIAL Y METODOS.</b>	13
Cultivo Celular.	13
Tratamientos.	13
Viabilidad celular.	13
Tinción nuclear con Bromuro de Etidio.	13
Preparación de extractos celulares (proteínas totales).	14
Preparación de extractos citosólicos.	14
Experimento de Bradford	14
Análisis de proteínas por Western blot.	15
Inmunohistoquímica.	15
♦ <b>RESULTADOS.</b>	17
♦ <b>DISCUSION.</b>	24
♦ <b>CONCLUSIONES.</b>	27
♦ <b>BIBLIOGRAFIA.</b>	28

## **ABREVIATURAS.**

- aa- Aminoácidos.
- AIF- Factor inductor de apoptosis.
- Bcl-2- Gen 2 de linfoma de células B.
- BH- Homología de la familia Bcl-2.
- BrEt- Bromuro de etidio.
- CBG- Globulina de unión a corticosteroides.
- CGH- Hormonas glucocorticoides.
- DMEM- Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco.
- DNA- Acido desoxirribonucleico.
- DEX- Dexametasona.
- EDTA- Acido etilenodiaminotetraacético.
- G- Guanina.
- GR- Complejo receptor glucocorticoide.
- GRE- Elementos que responden a glucocorticoides.
- h- Horas.
- ICE- Enzima convertidora de interleucina 1.
- IAP- Familia de proteínas inhibidoras de apoptosis.
- Kb- Kilobases de DNA.
- KDa- Kilo daltones.
- M- Molar.
- min- minutos.
- ml- Mililitros.
- µl- Microlitros.
- nm- Nanómetros.
- pb- Pares de bases.
- PBS- Amortiguador salino de Fosfato.
- PT- Poro de transición.
- RNA- Acido ribonucleico.
- RNAsa- Ribonucleasa A.
- SDS- Dodecil sulfato de sodio.
- SFB- Suero fetal bovino.
- TBS- Amortiguador Tris salino.
- Tris- (Tris (Hidroximetil) amino metano).
- UV- ultravioleta.

## **RESUMEN.**

El crecimiento de las células HeLa se inhibió cuando se expusieron a la dexametasona a diferentes concentraciones. Así también se inhibió la apoptosis inducida por cisplatino de manera dependiente al tiempo de pre-tratamiento con este glucocorticoide sintético a todas las concentraciones usadas. Esta inhibición del proceso apoptótico no se correlacionó con alguna modificación en los cambios inducidos por el cisplatino en las proteínas pro-apoptóticas Bak, Bcl-xS y Bid. Sin embargo si se correlacionó con cambios en la expresión de una isoforma de la proteína pro-apoptótica Bax. Los cambios observados en las proteínas anti-apoptóticas analizadas Bcl-2, Bcl-xL y Bag no se relacionaron con la actividad protectora de la DEX. Al analizar la integridad de la mitocondria se demostró que la DEX protege parcialmente a este organelo de los daños producidos por el cisplatino, pero no causa cambios en la expresión del citocromo c.

## INTRODUCCIÓN.

### **APOPTOSIS.**

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso indispensable en el desarrollo animal y la homeostasis adulta (Porter AG, 1999), funciona eliminando células no deseadas, este programa de autodestrucción mantiene el balance en las distintas poblaciones celulares (Dole y cols., 1995).

En la primera mitad del siglo XX quienes investigaron el desarrollo embrionario se percataron de que la muerte celular no era, como se había pensado, forzosamente dañina para el organismo; en los años cincuenta se demostró que ciertos organismos pluricelulares alcanzaban su morfología final seleccionando determinadas células y luego eliminándolas (Duke y cols., 1997). En 1972 Kerr y cols. señalaron que las características morfológicas de la muerte celular ocurrida de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática y el balance entre proliferación y muerte en sistemas experimentales con roedores son diferentes a las que presenta la muerte que ocurre como resultado de patologías o intoxicación. Fue entonces cuando se acuñó el término apoptosis para distinguir este fenómeno comparado con el suicidio a nivel celular de la necrosis (Gómez y Zentella, 1997).

### **Apoptosis vs necrosis.**

Los procesos que ocurren durante la apoptosis son muy distintos a los que acompañan a la muerte por necrosis (Tabla 1), (Green y Reed, 1998).

Tabla 1. Comparación de características bioquímicas y macromoleculares entre la muerte celular por necrosis y por apoptosis (Tomado de Kerr y cols., 1991)

<b>NECROSIS</b>	<b>APOPTOSIS</b>
La participación celular es pasiva, no hay control genético de por medio.	La participación celular es activa, controlada por un programa genético.
El volumen celular aumenta	El volumen celular se reduce en un 25% - 50%.
El DNA se fragmenta de manera irregular, el patrón es de barrido.	La fragmentación internucleosomal, patrón de escalera (180 pb o múltiplos).
La cromatina nuclear muestra una condensación laxa y su localización es difusa.	La cromatina nuclear se condensa de manera compacta con marginación nuclear.
Los orgánulos se hinchan y tienden a fusionarse con los lisosomas.	Los orgánulos permanecen íntegros y no se fusionan con lisosomas.
El citoesqueleto se desorganiza.	El citoesqueleto conserva su estructura.
El citoplasma se vierte al espacio intersticial.	El citoplasma se conserva en los cuerpos apoptóticos.
La membrana celular conserva la asimetría de fosfolípidos y se pierde la integridad.	Aparición de fosfatidilserina en la lámina extracelular de la membrana plasmática y se conserva la impermeabilidad.
La activación de proteasas es inespecífica.	La activación de proteasas es específica de la familia de las caspasas.
Reacción inflamatoria.	Reacción inflamatoria ausente.



Se reconocen dos fases durante el proceso de muerte celular por apoptosis: una de latencia y otra de ejecución, la fase latente comienza con el estímulo pro-apoptótico, las células se observan morfológicamente normales aún cuando los mecanismos intracelulares involucrados en la activación de proteínas asociadas a la ejecución ya estén activados; esta fase concluye en un estado celular denominado "de compromiso" que se asocia con alteraciones mitocondriales, después del cual la muerte celular es ineludible (Samejima y cols., 1998). En la fase de ejecución se reduce el volumen celular, la cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear, ésta se invagina y el núcleo se fragmenta dando lugar a estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. Análogamente la membrana celular sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos; los cuerpos apoptóticos *in vivo* son rápidamente fagocitados por células vecinas, para que esto suceda las células apoptóticas sufren cambios en la permeabilidad y composición de la membrana plasmática, la fosfatidilserina cambia su ubicación hacia la cara externa de la membrana celular, esto permite a los receptores específicos y a los antígenos del sistema de histocompatibilidad mayor reconocer a los cuerpos apoptóticos (Kerr y cols., 1991). Una de las consecuencias fisiológicas de la apoptosis es que no se libera material intracelular al medio intersticial, además este proceso está restringido a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas en las que no se haya activado el programa de muerte (Duke, 1992). Otro aspecto importante que tiene lugar en la muerte por apoptosis es el corte al DNA; se puede advertir al someter el DNA a una separación por electroforesis, un patrón de bandas característico llamado "escalera" que muestra los fragmentos de DNA múltiplos de 180 bases, este número corresponde a la longitud de DNA que se enrolla alrededor de cada nucleosoma (Vaux, 1993; Peitsch y cols., 1994), este corte es realizado por endonucleasas específicas que tienen acceso a las regiones internucleosomales del DNA (Peitsch y cols., 1994). Recientemente se ha identificado a la enzima responsable del rompimiento del DNA durante el proceso apoptótico, se trata de la DNasa CAD la cual es activada por la caspasa 3 (Counis, 2000).

### **Genes involucrados en la apoptosis.**

Los estudios con el nemátodo *Caenorhabditis elegance* demostraron que la muerte apoptótica está controlada por la expresión de algunos genes (Ellis y cols., 1991). Entre los genes relacionados con el proceso apoptótico identificados en estudios con nemátodos se identificó a *ced-3* que induce el programa de muerte, así mismo se observó que el papel de *ced-9* es el de inhibir tal proceso. La caracterización de la estructura y función de los productos de estos genes permitió identificar a los genes homólogos en células de mamíferos; las proteínas homólogas CED-3 se agruparon en una familia de proteasas denominadas caspasas, evidencia experimental sugiere que la señal apoptótica activa primero a las caspasas iniciadoras en la fase latente y éstas a su vez a las efectoras responsables de la fase ejecutora y

de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Kim y cols., 1997). Las proteínas homólogas a CED-9 constituyen la familia de Bcl-2.

### **FAMILIA BCL-2.**

Bcl-2 fue el primer miembro descrito de la familia de proteínas Bcl-2 (Gross y cols., 1999), éste se identificó inicialmente como un gen asociado al desarrollo de leucemias granulocíticas de células B, de donde deriva su nombre (B-cell leukemia gene 2) (Gómez y Zentella, 1997). La familia de Bcl-2 está compuesta por varios miembros -al menos 16- que se dividen en proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Adams y Cory, 1998). Entre los inhibidores apoptóticos de esta familia están: Bcl-2 proteína de 24-26 KDa, se localiza en el interior mitocondrial; Bcl-xL es una de las dos variantes del gen *bcl-x*; se localiza en el citosol asociado con la mitocondria pesa aproximadamente 30 KDa; Bag de 24.5 KDa no tiene una homología considerable con Bcl-2, sin embargo la coexpresión de ambas proteínas incrementan la protección frente a la apoptosis. Algunos de los miembros pro-apoptóticos son: Bak una proteína de 23 KDa induce muerte expresándose en varios tipos celulares; cuando Bax de 21 KDa se expresa pobremente en células de cáncer, contribuye a la progresión de la displasia, Bcl-xS es otra de las variantes de Bcl-x, su peso es menor que el de Bcl-xL aproximadamente de 25 KDa.

La proporción existente en una célula de estos dos subgrupos ayuda a determinar la susceptibilidad de las células a una señal de muerte (Oltvai y cols., 1993). Varios miembros pro-apoptóticos de la familia se localizan en compartimentos subcelulares aislados en el citosol o citoesqueleto. En ausencia de una señal de muerte, los miembros anti-apoptóticos son generalmente proteínas integrales de membrana encontradas en la mitocondria, el retículo endoplásmico o la membrana nuclear (Hockenbery y cols., 1990; Krajewsky y cols., 1993; Nguyen y cols., 1993; De Jong y cols., 1994; Zhu y cols., 1996;).

### **Dimerización.**

Los miembros proteínicos de esta familia forman homodímeros y heterodímeros, lo que sugiere una competencia neutralizante entre estas proteínas (Tabla 2) (Gross y cols., 1999) por ejemplo: la sobreexpresión de la proteína Bax promueve la muerte al interferir con la formación de homodímeros Bcl-2 al competir y formar en su lugar heterodímeros Bcl-2=Bax (Gómez y Zentella, 1997) se ha propuesto que la capacidad protectora de Bcl-2 se sustenta en formar homodímeros, versiones carentes de dominio de homodimerización no tienen capacidad anti-apoptótica.

Tabla 2. Proteínas de la familia Bcl-2 y sus interacciones al dimerizar (Tomada de Hacker y Vaux, 1995).

Miembro	Homodimerización	Heterodimerización
Bcl-2	Muy estable	Bax (muy estable) Bak (estable)
Bcl-x <sub>L</sub>	Estable	Bax (muy estable) Bak (muy estable)
Bcl-x <sub>S</sub>	Estable	Bcl-2 (estable) Bcl-x <sub>L</sub> (estable)
Bax	Muy estable	Bcl-2 (muy estable)
Bak	Muy estable	Bcl-2 (estable)

### Dominios conservados de homología Bcl-2 (BH).

Los miembros de esta familia poseen hasta cuatro dominios conservados de la homología *bcl-2* (BH) designados: BH1, BH2, BH3 y BH4 además de un dominio transmembranal (Fig. 1) éste último sirve a las proteínas que lo poseen para anclarse a las membranas que los sustentan (Adams y Cory, 1998; Kelekar y cols., 1998; Reed, 1998). Muchos de los miembros anti-apoptóticos muestran secuencias conservadas de los 4 dominios y pueden convertirse en promotoras de muerte si pierden el dominio BH4 (Cheng y cols., 1997). Los miembros pro-apoptóticos frecuentemente no poseen la secuencia de BH4 (Yuan y cols., 1999; De la Coste y cols., 1999). BH4 sirve a Bcl-2 y a Bcl-x<sub>L</sub> para heterodimerizar con Bag. Los dominios BH1 y BH2 están involucrados en la formación de homodímeros de Bcl-2 y están presentes en todos los antagonistas de muerte (Kroemer, 1997; Reed, 1997), estos dominios son indispensables para las interacciones con miembros pro-apoptóticos (Sedlak y cols., 1995). Los miembros pro-apoptóticos Bak y Bax tienen también intactos los dominios BH1 Y BH2 (Chittenden y cols., 1995; Zha y cols., 1996) Estos dos últimos miembros pro-apoptóticos son multifuncionales; por un lado causan muerte celular actuando como canales en la mitocondria, ésto permiten el paso de iones y por otro lado heterodimerizando con miembros anti-apoptóticos mediante su dominio BH3 (Minn y cols., 1996; Kelekar y Thompson, 1998).

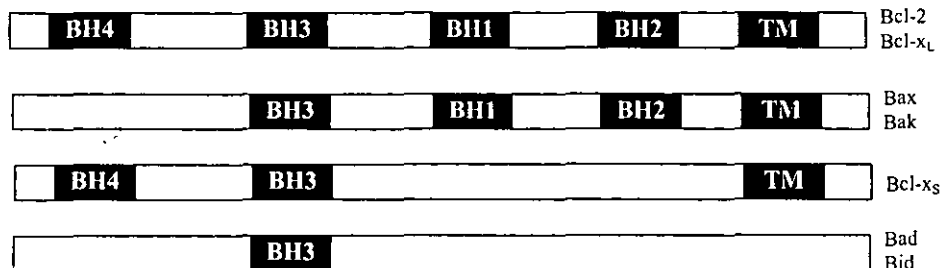


Fig. 1. Homologías de la familia Bcl-2 y sus dominios transmembranales (TM). Sólo Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> presentan los cuatro dominios, todos los miembros pro-apoptóticos carecen del dominio BH4 y Bad y Bid presentan la homología más débil por sólo haber conservado el dominio BH3. (Tomado de Kelekar y Thompson, 1998).

### **Bcl-2 y mitocondria.**

La mitocondria juega un papel muy importante en la apoptosis, varios eventos clave de la muerte celular programada convergen en este organelo, como la liberación de activadores de caspasas (citocromo c) u otros activadores apoptóticos como AIF (Factor inductor de apoptosis) que actúa como activador directo de las DNAsas nucleares (Susin y cols., 1999); la formación del megaporo; la pérdida de potencial transmembranal y la participación de las proteínas de la familia Bcl-2. Por esto es considerada como un punto de regulación y de compromiso para el proceso apoptótico (Green y Reed, 1998). Una vez iniciada la apoptosis, pero antes de que inicien los cambios en el núcleo, las mitocondrias se ven afectadas en su potencial de membrana. Este colapso se asocia con la aparición de transición de poro (PT); una vez que ha cambiado la permeabilidad de la membrana mitocondrial, la entrada de agua es masiva hacia la matriz mitocondrial. Debido a que la membrana interna de la mitocondria posee una gran extensión superficial, el volumen de la mitocondria puede aumentar mucho sin que esta se rompa, a diferencia de la membrana externa la cual eventualmente se rompe liberando citocromo c y AIF (Petit, 1998). Una vez liberado de la mitocondria el citocromo c se liga a Apaf-1 y también sale de la mitocondria, ambos se unen mediante un dominio de reclutamiento a caspasas. Este complejo es capaz de activar a la pro-caspasa 9 y posteriormente a la caspasa ejecutora 3 (Li y cols., 1997). Se ha propuesto que Bcl-2 inhibe la formación de PT (Susin y cols., 1999). También se sabe que la mitocondria contiene una proteína llamada AIF que se libera cuando el potencial de membrana se colapsa, esto afecta directamente al núcleo produciendo condensación en la cromatina y fragmentación internucleosomal, cuando Bcl-2 se sobre expresa en la cara externa de la membrana mitocondrial impide la liberación de AIF. Bcl-2 no altera la formación de AIF ni protege a la célula de este factor; todo parece indicar que Bcl-2 protege de apoptosis favoreciendo la retención de AIF en la mitocondria (Susin y cols., 1996). El principal mecanismo de acción descrito para la familia de proteínas Bcl-2 es el de modificar la permeabilidad de la membrana. Se ha comprobado que Bcl-2 es capaz de regular la salida del citocromo c de la mitocondria (Okuno y cols., 1998) y así evitar la activación de la caspasa 3. Bax forma poros, esto altera el potencial de membrana. También la proteína pro-apoptótica Bid si se une a mitocondria induce la liberación del citocromo c (Perkins y cols., 1998).

### **VIAS DE SEÑALIZACION APOPTOTICA.**

Se han establecido tres vías de señalización apoptótica: la primera es debido a la interacción de receptores de membrana con sus respectivos ligandos, los cuales a través de moléculas adaptadoras reclutan y activan caspasas. La segunda es iniciada por diversos estímulos apoptóticos y es regulada por la familia de Bcl-2 lo que finalmente provoca la salida del citocromo c de la mitocondria y la consiguiente cascada de caspasas. La tercera vía es iniciada por daño en el DNA y finaliza con la activación de las caspasas, ésta última no se ha caracterizado muy bien (Dragovicht, 1998).

## CISPLATINO (Cis-diaminodicloroplatino II).

Este compuesto metálico inorgánico (Fig. 2) hallado en 1965 por Rosenberg y cols. es un potente electrófilo que reacciona con cualquier nucleófilo, como los grupos sulfhidrilo en proteínas y grupos nucleofílicos en ácidos nucleicos (Rosenberg y cols., 1965)

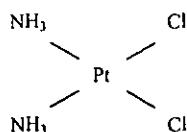


Fig. 2. Representación molecular del Cisplatino (Tomado de Velásquez, 1998).

### Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de esta droga está basado en su interacción y consecuente producción de lesiones en el DNA genómico; se ha demostrado que existe una correlación directa entre la citotoxicidad y la magnitud del daño al DNA. Las lesiones en el DNA consisten en aductos intra e intercatenarios (Fig. 3) principalmente entre guaninas y adeninas- guaninas (Fichtinger-Shepman y cols., 1985).

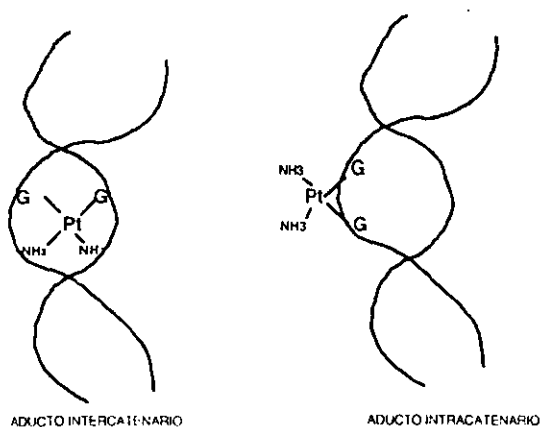


Fig. 3. Representación esquemática de los 2 tipos de aductos formados por cisplatino en el DNA (Tomado de Fichtinger-Shepman y cols., 1985).

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para este compuesto antineoplásico: 1) La inhibición de la síntesis de DNA, impidiendo así el crecimiento celular; 2) inhibición de síntesis de RNA imposibilitando la síntesis de proteínas indispensables para la vida celular y 3) la inducción de muerte celular por apoptosis (Maldonado y cols., 1995). También se han descrito fenómenos celulares provocados

por esta droga, cuya participación podría tener importancia en la determinación de la sensibilidad y resistencia del fármaco tal como la participación de los mecanismos de reparación del DNA (Meléndez y cols., 1998).

### **Cisplatino y apoptosis.**

El cisplatino como otros fármacos antineoplásicos induce apoptosis de manera dependiente a la concentración y al tiempo de exposición de la droga (Maldonado y cols., 1995). Se ha reportado que el cisplatino induce arresto de la célula en la fase G2 del ciclo, previo a la inducción de muerte celular (Sorenson y cols., 1990); sin embargo concentraciones mayores son capaces de inducir muerte celular, independientemente de la fase del ciclo en que se encuentre la célula y sin la existencia de un arresto previo. A partir del daño sobre el genoma, uno o varios sensores de daño como la proteína ATM (proteína supresora de tumores mutada en el síndrome de ataxia telangiectasia) comunican, mediante interacciones proteína-proteína la presencia de daño a las proteínas efectoras tales como p53, que a su vez amplifican la respuesta a una diversidad de proteínas efectoras (Baskaran y cols., 1997). Este fármaco tiene particular importancia en el tratamiento de pacientes con carcinoma de ovario y testículo (Higby y cols., 1974; Young y cols., 1979). Se ha reportado que las células HeLa pueden ser inducidas hacia el proceso apoptótico como resultado a tratamiento con cisplatino después de 18 horas de exposición a la droga (Maldonado y cols., 1995; Meléndez-Zajgla y cols., 1996; Velásquez y cols., 1998).

### **CELULAS HeLa.**

La línea celular HeLa fue la primera estirpe epiteloide y aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida por un cultivo celular seriado. fue aislada por Gey y cols. en 1951, proveniente de carcinoma anaplásico de cérvix uterino de una mujer de 31 años llamada Henrietta Lack. Desde entonces las células HeLa son un cultivo muy utilizado en numerosos laboratorios del mundo, en especial en estudios de oncología experimental. Su relativa facilidad para ser cultivada en monocapa en condiciones de laboratorio y su morfología, son aspectos que han motivado la utilización de esta línea celular como un modelo para estudiar la apoptosis. En las células HeLa el ciclo de división se lleva a cabo aproximadamente cada 20 h (Nelson-Rees y cols., 1980). También se ha reportado que las células HeLa contienen receptores específicos de gran afinidad para CGH correspondientes a 20,000 por célula (Cidlowski y Cidlowski, 1981).

### **GLUCOCORTICOIDES**

En la corteza de la glándula suprarrenal se sintetizan distintas moléculas esteroides, pero sólo unas cuantas tienen actividad biológica, entre estas se encuentran los glucocorticoides. Las hormonas glucocorticoides (CGH) derivan del pregnano de 21 átomos de carbono (Fig. 4) (Pasqualine, 1973).

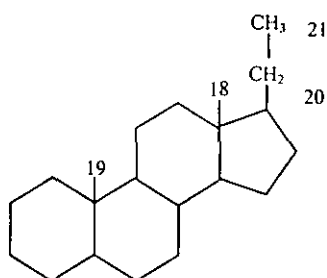


Fig. 4. Estructura del pregnano, precursor de los glucocorticoides.

La síntesis de CGH se inicia cuando las células toman colesterol circulante, una vez en sangre la mayor parte de la producción se unen a una proteína llamada globulina de unión a corticosteroides (CBG) (Thompson, 1974) la cual funciona como proteína transportadora (Barden y cols., 1977), proceso que esquivaba el problema de la solubilidad. La hormona atraviesa la membrana plasmática y encuentra receptores en el citosol o en el núcleo de la célula blanco (Granner y Hargrove, 1983).

### Mecanismo de acción.

Una vez en el interior de la célula las CGH se unen a una proteína receptora específica y forma el complejo glucocorticoide-receptor (GR), el complejo sufre cambios fisicoquímicos y es transformado a un estado afin al DNA, a este proceso se le llama activación (Moudgil y cols., 1986). Posteriormente viene una relocalización del GR hacia el núcleo donde interactúa con los elementos que responden a glucocorticoides (ERG) ubicados en el DNA, lo cual se traduce como estímulo o inhibición de la expresión de genes específicos sensibles a la hormona (Granner y Hargrove, 1983).

### Dexametasona.

Existen compuestos sintéticos con actividad CGH, en ocasiones la actividad biológica de estas moléculas está aumentada, por ejemplo la presencia de un átomo de flúor en el carbono 9 y la metilación en el carbono 16 en el caso de la DEX. Estos compuestos se unen débilmente a las proteínas plasmáticas y por eso circulan como hormonas libres y activas además de ser más estables, tienen una vida media más larga y mayor afinidad por los receptores citoplasmáticos (Calandra y cols., 1995). También la llamada 9 alfa fluoro 16 alfa metilprednisolona es el glucocorticoide más estable además de ser muy usado en clínica como antiemético en la náusea inducida por la quimioterapia.

### **ANTECEDENTES.**

Aunque los primeros reportes atribuyeron a la DEX un efecto de inductor de apoptosis principalmente en el sistema inmune, ahora se sabe que puede tener una acción contraria, ésto es, inhibe el proceso apoptótico.

El primer reporte en el cual se demuestra que la DEX tienen una actividad anti-apoptótica fue en 1997. D´Adamio y cols. reportaron que la DEX protege las células T de apoptosis inducida con antiCD3. A partir de entonces existen varios trabajos que vinculan la protección a quimioterapia con un pretratamiento con DEX en diversas células de cáncer (Carollo, 1998; Nauman, 1998). Actualmente se sabe que los glucocorticoides son capaces de inhibir la apoptosis en células de hepatoma de rata, células neuroepiteliales (Kawamura y cols., 1998) y linfocitos. (Riccardi y cols., 1999).

Se ha vinculado esta capacidad de protección con la regulación de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL (Yamamoto y cols., 1998, Huang y Cidlowski., 1999, Gorman y cols., 2000, Kobzdij y cols., 2000). Así también con la inhibición del cambio en el potencial de membrana mitocondrial frecuente durante la apoptosis. (Evans-Storms y Cidlowsky 2000).

La vía exacta por la cual este glucocorticoide sintético inhibe la apoptosis se desconoce.



### **JUSTIFICACION.**

Muchas drogas antineoplásicas ejercen su acción induciendo apoptosis en células de cáncer, sin embargo algunos pacientes presentan resistencia a éstas. Esto puede deberse a que poseen algún (os) mecanismo (s) de inhibición apoptótica. El cisplatino induce apoptosis en células de cáncer cervicouterino y se sabe que la DEX regula este proceso, por lo tanto es de gran interés entender a nivel molecular los eventos involucrados en este efecto. Además ya que el cisplatino es un fármaco utilizado en clínica estos estudios pueden colaborar a proponer nuevos esquemas de tratamiento, sobre todo en pacientes que presentan resistencia al cisplatino.

### **HIPOTESIS.**

La DEX contrarresta el proceso apoptótico inducido por cisplatino en células HeLa y en este efecto intervienen miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2; así como algunos pro-apoptóticos inhibiendo la protección frente a la apoptosis.

### **OBJETIVOS GENERALES.**

- 1) Determinar si la DEX inhibe el proceso apoptótico inducido por cisplatino en las células HeLa.
  
- 2) Determinar si en la inhibición de la apoptosis por DEX intervienen algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1) Determinar si la DEX inhibe el proceso apoptótico inducido por cisplatino en las células HeLa, de manera dosis-tiempo dependiente.
  
- 2) Determinar si en la inhibición de la apoptosis inducida por cisplatino en células HeLa por DEX, intervienen algunos de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xL y Bag
  
- 3) Determinar si algunos de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bax, Bak, Bid, y Bcl-xS afectan negativamente la inhibición de la apoptosis inducida por cisplatino en células HeLa por DEX.

## **MATERIALES Y METODOS.**

### **Cultivo celular.**

Las células HeLa se crecieron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> se cultivaron a baja densidad (25%).

### **Tratamientos.**

A) Se realizó el siguiente experimento para analizar el efecto de diferentes concentraciones de DEX en la protección frente a la apoptosis. En cajas de 24 pozos se sembraron 30,000 células HeLa con 500 µl de DMEM con SFB/pozo. Se aplicaron los siguientes tratamientos por triplicado: Testigo; células pretratadas durante 24 h sólo con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M), ( $1 \times 10^{-6}$  M) y ( $1 \times 10^{-7}$  M); células mas cisplatino 40 µM por 18 h. células mas cisplatino 40 µM por 18 h. pretratadas 24 h con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M), ( $1 \times 10^{-6}$  M) y ( $1 \times 10^{-7}$  M).

B) Se realizó otro experimento para encontrar el tiempo de exposición a DEX que ofrece mayor protección con los siguientes tratamientos: Testigo; Células pretratadas sólo con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) por 24 h; células mas cisplatino 40 µM por 18 horas y DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) sin pretratamiento, con pretratamiento de 3, 6, 12 y 24 h.

### **Viabilidad celular.**

Trascurrido el tiempo de exposición al estímulo se retiró el medio y se fijaron las células con etanol frío al 70% a -20°C durante 10 min. Se retiró el alcohol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se adicionaron 300 µl de cristal violeta 1X durante 5 min, se lavaron los pozos por inmersión en agua y las cajas se secaron a temperatura ambiente. Se adicionaron 300 µl de ácido acético al 33% a cada pozo, se tomaron alícuotas de 100 µl y se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA. Se calculó el porcentaje de viabilidad y de desviación estándar para cada concentración tomando como 100% a las células testigo.

### **Tinción nuclear con bromuro de etidio.**

Se sembraron 50,000 células HeLa en cajas de cultivo- portaobjetos. Los estímulos que se aplicaron fueron: Testigo; DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h; Cisplatino 40 µM 18 h y pretratamiento con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h, con cisplatino 40 µM 18 h. Finalizados los tiempos de exposición las células se fijaron en etanol al 70% durante 10 min a -20 °C. Se lavaron con PBS 1X y después se incubaron con RNAsa (10 µl/ml). durante 2 h a 37°C. Se lavaron con PBS 1X y se les agregó BrEt (10µl/ml). Después de 5 min se enjuagaron con PBS 1X y se montaron con una mezcla 1:1 glicerol-PBS 1X. Se observaron al microscopio de fluorescencia, se contaron en distintos campos tanto células normales como apoptóticas. Se tomaron fotografías en película blanco y negro plus X pam Kodak.

### **Preparación de extractos celulares (proteínas totales).**

Se sembraron en 4 cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> 500,000 células en 10 ml de DMEM con SFB al 10%. Se aplicaron los tratamientos: testigo; DEX (1x10<sup>-5</sup> M) 24 h, cisplatino 40 µM 18 h y pretratamiento con DEX (1x10<sup>-5</sup> M) 24 h con cisplatino 40 µM 18 horas. Completados los tiempos se eliminó el medio de cada caja y se enjuagó con PBS 1X, con un raspador se rasparon los fondos de las cajas para obtener las células. Se centrifugaron las muestras en la nanofuga. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo un botón celular al cual se le agregó 300 µl de solución de lisis de Laemmli. Se resuspendieron las células lisadas con una jeringa de insulina con la finalidad de fragmentar su DNA, las muestras se centrifugaron a 78,200 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, se hirvió y se agregaron 50 µl de Beta mercapto, los extractos se guardaron a -20°C para posteriormente usarse en la técnica de Western blot.

### **Preparación de extractos citosólicos.**

Se sembraron en 4 cajas petri de 75 cm<sup>2</sup> 500,000 células en 10 ml de DMEM con SFB al 10%. Se aplicaron los tratamientos: testigo; DEX (1x10<sup>-5</sup> M) 24 h, cisplatino 40 µM 18 h y pretratamiento con DEX (1x10<sup>-5</sup> M) 24 h con cisplatino 40 µM 18 horas. Completados los tiempos se eliminó el medio de cada caja y se enjuagó con PBS 1X, con una espátula se rasparon los fondos de las cajas para obtener las células. Se centrifugaron las muestras en la nanofuga. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo un botón celular al cual se lisó con Tris 10 mM, EDTA 1 µM, KCl 25 mM y agarosa 250 µM. Se resuspendieron las células lisadas con una jeringa de insulina con la finalidad de fragmentar su DNA, parte de las muestras se centrifugaron a 3,000 g durante 5 min para obtener extractos mitocondriales. Otra parte de las muestras se centrifugó a 10,000g durante 10 min, otra parte se centrifugó a 100,000 g durante 1 h para obtener el extracto de membranas ligeras. El sobrenadante, se hirvió y se agregaron 50 µl de Beta-mercapto, los extractos se guardaron a -20°C para cuantificar la concentración de proteína mediante el experimento de Bradford .

### **Experimento de Bradford.**

Se realizó una curva patrón con la proteína albúmina (1mg/ml) (Tabla 3):

Tabla 3. Volúmenes empleados para la elaboración de una curva patrón de diferentes concentraciones de albúmina.

ALBÚMINA [ ]	H <sub>2</sub> O (µl)	BRADFORD(µl)	VOLUMEN TOTAL(µl)
1	99	400	500
5	95	400	500
10	90	400	500
15	85	400	500

Las muestras de albúmina colocan en celdas para su lectura. Se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro, por medio de un programa de computo los resultados se emplearon para ajustar la ecuación de una recta.

Se tomaron 5  $\mu$ l de cada condición: testigo; DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h, cisplatino 40  $\mu$ M 18 h y pretratamiento con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h con cisplatino 40  $\mu$ M 18 h y se agregaron 95  $\mu$ l de agua y 400  $\mu$ l de Bradford se incubó la reacción durante 5 min Las muestras se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro para interpolar los datos en la ecuación de la curva patrón y obtener las concentraciones.

Una vez igualadas las concentraciones a 10  $\mu$ g de proteína por muestra se separaron en una electroforesis.

### **Análisis de proteínas por Western blot.**

Las proteínas de los extractos celulares se cuantificaron usando el método de Bradford. En geles de poliacrilamida desnaturalizantes (12%) se separaron 10  $\mu$ g de proteína total Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-seca (BIO RAD). Las membranas se bloquearon con leche descremada y se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 4) correspondientes a Bcl-2, Bak, Bax, Bad, Bid, Bag, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>S</sub> durante toda una noche a 4°C. Las membranas se lavaron con PBS 1X una h y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 4) correspondientes durante 2 h. Se lavaron con TBS 1X. El anticuerpo unido se detectó usando quimioluminiscencia (Boehinger Mannheim) con películas AR X-Omat Kodak.

Tabla 4. Concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección por Western blot.

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Concentración final</b>
Bcl-2 Calbiochem Oncogen	10 $\mu$ l/ml	Monoclonal	1 $\mu$ g/ml
Bak Calbiochem Oncogen	10 $\mu$ l/ml	Monoclonal	1 $\mu$ g/ml
Bax Calbiochem Oncogen	10 $\mu$ l/ml	Monoclonal	1 $\mu$ g/ml
Bcl-x <sub>L</sub> y Bcl-x <sub>S</sub> Calbiochem Oncogen	10 $\mu$ l/ml	Polyclonal	1 $\mu$ g/1ml
Bid Santa Cruz	5 $\mu$ l/ml	Goat Polyclonal	1 $\mu$ g/ml
Bag Calbiochem Oncogen	5 $\mu$ l/ml	Goat Polyclonal	1 $\mu$ g/ml

### **Inmunohistoquímica.**

Las células HeLa se sembraron en cajas de cultivo-portaobjetos bajo las condiciones iniciales anteriores. Los estímulos que se aplicaron fueron: Testigo, DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h, cisplatino 40  $\mu$ M 18 h, pretratamiento con DEX ( $1 \times 10^{-5}$  M) 24 h, con cisplatino 40  $\mu$ M 18 h. Las células se fijaron con metanol- acetona al 50% durante 10 min a -20 °C. Se lavaron con PBS albúmina al 3% y se les agregó una gota de peróxido de hidrógeno y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 min.

Se lavaron con PBS albúmina Se agregó el anticuerpo primario a una concentración de 0.5  $\mu$ l/50  $\mu$ l de PBS-albúmina durante 30 min en una cámara húmeda a 37°C. Se lavó con PBS y se puso una gota en cada celda de anticuerpo secundario unido a biotina y se mantuvo a 37°C durante 15 min. Se lavó con PBS y se agregó una gota de estreptavidina-peroxidasa, se incubó a temperatura ambiente 15 min. Se mezclaron peróxido mas diaminobenzidina y se incubó por 5 min. Se paró la reacción con agua cuando tomó coloración parda y se lavó con agua y se montó con glicerol-PBS 1:1 para observar al microscopio óptico.

## RESULTADOS.

### EFECTO DE DEX Y CISPLATINO SOBRE LA VIABILIDAD EN CELULAS HeLa.

Con el fin de analizar el efecto de la DEX sobre la viabilidad, se expusieron células HeLa cultivadas en medio a distintas concentraciones de esta CGH sintética (DEX  $1 \times 10^{-7}$  M, DEX  $1 \times 10^{-6}$  M y DEX  $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 h, se fijaron y se midió la viabilidad utilizando cristal violeta a una longitud de onda de 570 nm, en la Fig. 5 podemos observar que las células presentaron disminución en su viabilidad y/o en su crecimiento, la mayor disminución de la viabilidad se presentó a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M y fue aproximadamente del 20 % y de acuerdo con la Anova de una vía realizada ( $f=9.6$ ;  $P<0.001$ ) se encontraron resultados indicándonos que la DEX inhibe el crecimiento celular.

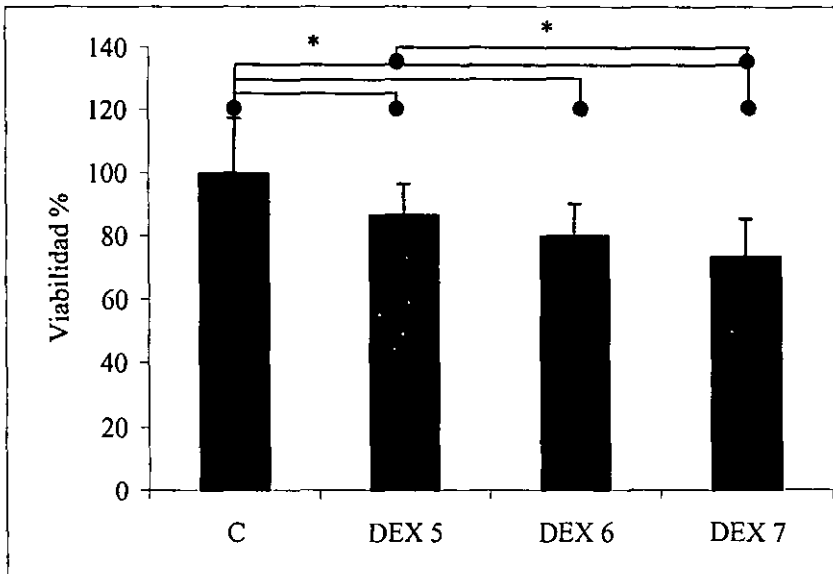


Fig. 5. Curva de viabilidad, se utilizaron células HeLa tratadas 24 h con distintas concentraciones de DEX: ( $1 \times 10^{-5}$  M), ( $1 \times 10^{-6}$  M) y ( $1 \times 10^{-7}$  M) 24 h comparados con el testigo. Donde Testigo (C), DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX5), DEX  $1 \times 10^{-6}$  M (DEX6) DEX  $1 \times 10^{-7}$  M (DEX7), los distintos tratamientos se grafican en X y los porcentajes de viabilidad en Y. Valores correspondientes a cuatro experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos indicados con una  $P < 0.05$  prueba *post hoc* LSD.

A continuación se comparó la viabilidad de las células testigo con las células expuestas con cisplatino ( $40 \mu\text{M}$ ) y con las células expuestas tanto a cisplatino ( $40 \mu\text{M}$ ) tanto con un pretratamiento por 24 horas con DEX a diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-5}$  M) (Fig. 6). Se observó una disminución en la viabilidad celular de más del 50% con la aplicación de cisplatino, como se esperaba, ya que



esta droga antineoplásica produce apoptosis. Cuando se aplicaron pretratamientos de 24 h de DEX la pérdida de viabilidad producida por el cisplatino fue menor alcanzando la mayor protección frente a la apoptosis a una concentración de DEX  $1 \times 10^{-5}$  M. De acuerdo a la prueba de Anova de una vía ( $f=62.56$ ;  $P<0.001$ ) estos resultados fueron significativos indicándonos que existe un efecto protector de la DEX frente a la apoptosis inducida por cisplatino según su concentración. Por esta razón, la concentración de DEX  $1 \times 10^{-5}$  M fue usada en el resto de los experimentos.

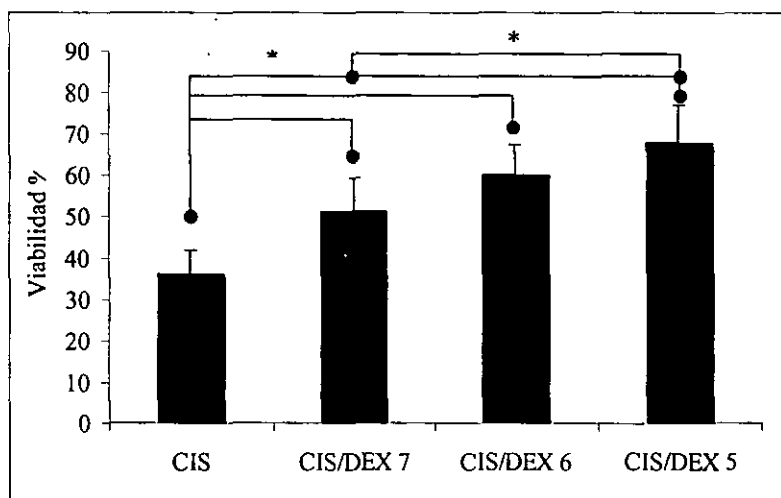


Fig. 6. Curva de viabilidad, se utilizaron células HeLa tratadas con cisplatino  $40 \mu\text{M}$  durante 18 h y pretratadas 24 h con distintas concentraciones de DEX: ( $1 \times 10^{-5}$  M), ( $1 \times 10^{-6}$  M) y ( $1 \times 10^{-7}$  M) comparados con células HeLa tratadas solo con cisplatino por 18 h; Donde cisplatino (CIS), cisplatino/DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (CIS/DEX5), cisplatino/DEX  $1 \times 10^{-6}$  M (CIS/DEX6) cisplatino/ DEX  $1 \times 10^{-7}$  M (CIS/DEX7), los distintos tratamientos se grafican en X y los porcentajes de viabilidad en Y. Valores correspondientes a cuatro experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos indicados con una  $P < 0.05$  prueba *post hoc* LSD.

El siguiente experimento consistió en el análisis de la viabilidad de células HeLa con diferentes tiempos de tratamiento de DEX (0, 6, 12 y 24 h) y su posterior exposición al cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (Fig. 7), se comparó cada tratamiento con células expuestas solo a cisplatino. De acuerdo a la prueba de Anova de una vía ( $f=20.83$ ;  $P < 0.001$ ) estos resultados fueron significativos indicándonos el efecto de protección que ejerce la DEX frente a la apoptosis es dependiente del tiempo de pretratamiento y se hace mayor mientras mas horas dura dicho pretratamiento.

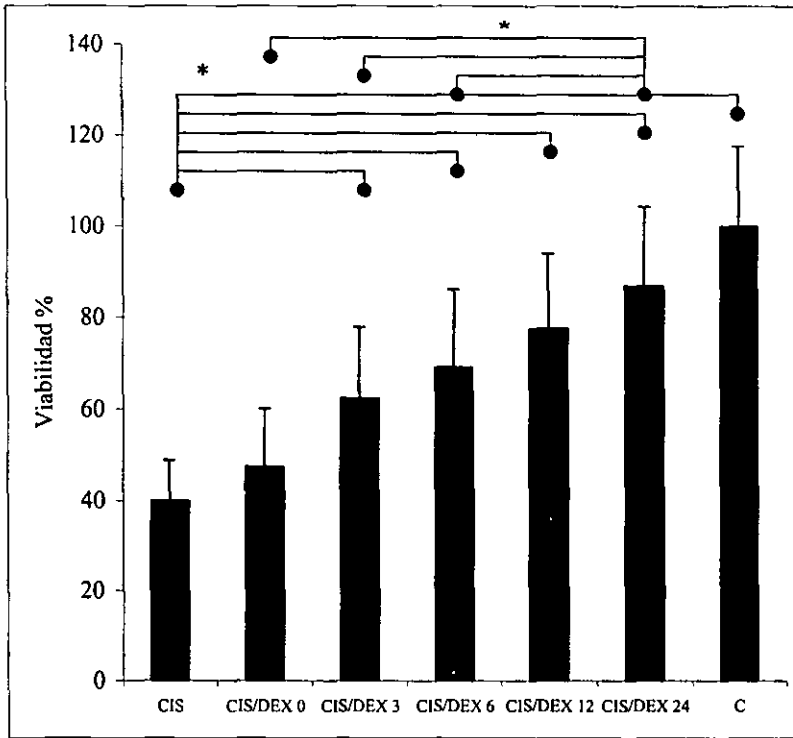


Fig. 7. Curva de viabilidad, se utilizaron células HeLa tratadas con cisplatino  $40 \mu\text{M}$  durante 18 h y pretratadas con DEX  $1 \times 10^{-5}$  M a distintos tiempos (0, 3, 6, 12, 24 h) comparados con células HeLa testigo; Donde cisplatino (CIS), cisplatino/DEX pretratamiento 0h (CIS/DEX0), cisplatino/DEX pretratamiento 3h (CIS/DEX3), cisplatino/DEX pretratamiento 6h (CIS/DEX6), cisplatino/DEX pretratamiento 12h (CIS/DEX12), cisplatino/DEX pretratamiento 24h (CIS/DEX24) y testigo (C); los distintos tratamientos se grafican en X y los porcentajes de viabilidad en Y. Valores correspondientes a cuatro experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos indicados con una  $P < 0.05$  prueba *post hoc* LSD.

Ya que se ha demostrado que la pérdida de viabilidad provocada por cisplatino se debe a la inducción del proceso apoptótico, decidimos analizar a nivel morfológico si la inhibición de esta pérdida de viabilidad ejercida por la DEX  $1 \times 10^{-5}$  se debía a una inhibición de la apoptosis.

### ANÁLISIS NUCLEAR

Se realizó el análisis morfológico de los núcleos de células HeLa sin tratamiento y con los diferentes tratamientos (DEX  $1 \times 10^{-5}$  M, CIS  $40 \mu\text{M}$  y CIS  $40 \mu\text{M}$  /DEX  $1 \times 10^{-5}$  M) mediante la tinción nuclear con BrEt, se contaron 400 núcleos por tratamiento para cuantificar los núcleos apoptóticos y los normales (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de núcleos sanos y apoptóticos con distintos tratamientos

TRATAMIENTO	%NUCLEOS SANOS	% NUCLEOS APOPTOTICOS
Testigo	100	0
DEX	96	4
CIS	55	45
DEX/CIS	83	17

En la Fig. 8 se muestran las fotos de los núcleos teñidos con BrEt de células testigo y con los diferentes tratamientos (DEX  $1 \times 10^{-5}$  M, CIS  $40 \mu\text{M}$ , CIS  $40 \mu\text{M}$  /DEX  $1 \times 10^{-5}$  M.). Se observó que en células testigo los núcleos están intactos (Fig. 8a), en las células tratadas con cisplatino  $40 \mu\text{M}$  se observaron características propias de la apoptosis tales como la morfología nuclear de condensación y fragmentación del DNA (Fig. 8b). Cuando se da un tratamiento con DEX  $1 \times 10^{-5}$  M anterior a la aplicación de cisplatino  $40 \mu\text{M}$  la cantidad de núcleos condensados y fragmentados es mucho menor (Fig. 8c). En el caso de las células tratadas con DEX  $1 \times 10^{-5}$  M hay una disminución en la población celular pero los núcleos no están fragmentados (Fig. 8d).

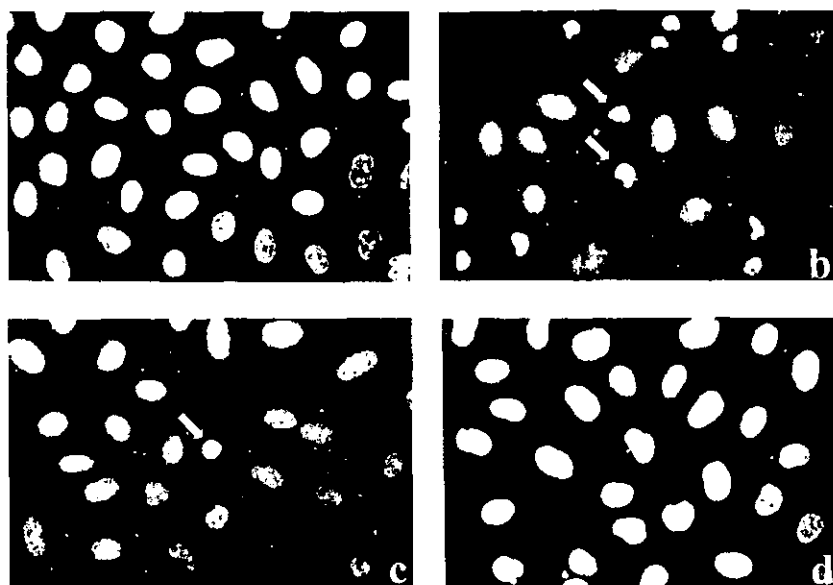


Fig. 8. Tinción con BrEt de núcleos de células HeLa, a) núcleos de células HeLa sin tratamiento, b) núcleos de células HeLa tratadas con cisplatino  $40 \mu\text{M}$  durante 18 h las flechas señalan unos núcleos apoptóticos, c) núcleos de células HeLa tratadas con cisplatino  $40 \mu\text{M}$  durante 18 h y pretratadas durante 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  M, la flecha señala un núcleo apoptótico, d) núcleos de células HeLa tratadas durante 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  M.

## ANÁLISIS DE LOS NIVELES PROTEICOS DE MIEMBROS DE LA FAMILIA BCL-2

Se analizaron algunas de las proteínas de la familia Bcl-2 involucradas en el proceso apoptótico. Por medio de Western blot se midió la expresión de Bcl-2, Bcl-xL, Bag, Bak, Bax, Bid, Bcl-xS en células HeLa. Donde Testigo (C), DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratamiento de 24 h de DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (CIS/DEX).

Como se muestra en la Fig. 9 los niveles de Bcl-2 se mantuvieron iguales al pretratar células HeLa con DEX, aumentaron ligeramente con CIS. Las células tratadas con ambos fármacos mostraron un nivel comparable con el presentado por las células testigo.

Cuando se analizó el nivel de expresión de otro miembro de la familia Bcl-2 con actividad anti-apoptótica se encontró, como se muestra en la Fig. 10 que Bcl-xL aumentó ligeramente tanto con el pretratamiento de DEX como con el tratamiento con CIS, pero disminuyó la expresión cuando se combinaron ambas drogas.

Los niveles de Bag se muestran en la Fig. 11. Con respecto a la expresión de esta proteína pro-apoptótica en las células control los otros 3 tratamientos tienen la misma densidad de banda. Se analizó la distribución de esta proteína por inmunohistoquímica y tampoco se encontró algún cambio (dato no mostrado).

En la Fig. 12 se observa que la expresión de la proteína pro-apoptótica Bak se mantiene al mismo nivel en el caso de las células testigo y las tratadas con DEX, en los tratamientos con CIS y CIS/DEX las células expresaron niveles más altos de esta proteína.

Se analizó también la proteína Bax, en la Fig. 13 se aprecia que la isoforma w mantiene su expresión con DEX si bien disminuye con el tratamiento de CIS. Con el tratamiento de CIS/DEX el doble bandeo desaparece.

Como se muestra en la Fig. 14 la proteína pro-apoptótica Bcl-xS no se detectó en las células testigo ni en las expuestas a DEX si bien con CIS y CIS/DEX si se expresa.

Cuando se analizó el nivel de expresión de otro miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 se encontró como se muestra en la Fig. 15 que Bid se mantiene igual tanto en las células testigo como en las tratadas con DEX, y se activa por corte al tratar células con CIS y CIS/DEX.

## Anti-apoptóticos

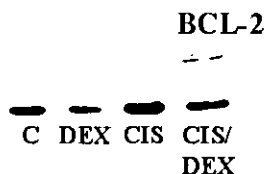


Fig 9 Ensayo de Western blot para la proteína Bcl-2, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

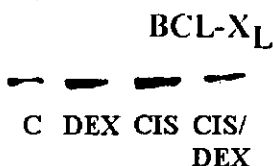


Fig 10 Ensayo de Western blot para la proteína Bcl-xL, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

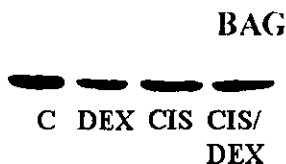


Fig 11 Ensayo de Western blot para la proteína Bag, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

## Pro-apoptóticos

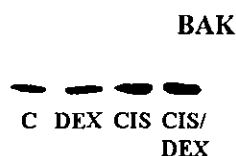


Fig 12 Ensayo de Western blot para la proteína Bak, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

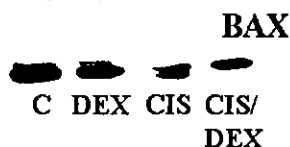


Fig 13 Ensayo de Western blot para la proteína Bax, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

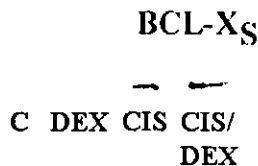


Fig 14 Ensayo de Western blot para la proteína Bcl-xS, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

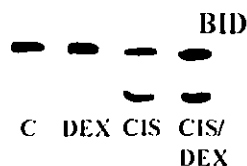


Fig 15 Ensayo de Western blot para la proteína Bcl-xS, extractos de proteínas totales de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

Se realizó también un Western blot para detectar los niveles de citocromo c citosólicos en células HeLa tratadas, como se puede apreciar en las células HeLa tratadas con cisplatino la cantidad de citocromo c citoplásmico aumenta, ya que la mitocondria esta dañada y con DEX o DEX mas cisplatino la cantidad es menor lo cual sugiere que la DEX tiene un efecto protector en la mitocondria(Fig. 16).

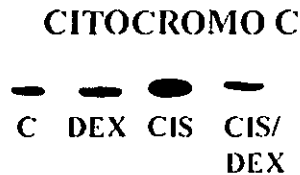


Fig 16 Ensayo de Western blot para la proteína, citocromo c, extractos citosólicos de células HeLa. Donde testigo (C), expuestas a DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y expuestas a cisplatino  $40 \mu\text{M}$  y pretratadas 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX). Imagen representativa

Tomando como referencia el control, los cambios en los niveles proteicos de los miembros analizados de la familia Bcl-2 se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Niveles de expresión de algunos de los miembros de la familia Bcl-2 con distintos tratamientos: DEX  $1 \times 10^{-5}$  M (DEX), cisplatino  $40 \mu\text{M}$  (CIS) y cisplatino  $40 \mu\text{M}$  con pretratamiento de 24 h con DEX  $1 \times 10^{-5}$  (CIS/DEX) con respecto al testigo.

Prot/Trat	DEX	CIS	CIS/DEX
Bcl-2	Disminuye	Aumenta	Aumenta
Bcl-Xl	Aumenta	Aumenta	Aumenta
Bag	Igual	Igual	Igual
Bak	Igual	Aumenta	Aumenta
Bax	Igual	Aumenta, isoforma	Igual, desaparece isoforma
Bcl-xS	No expresa	Se expresa	Se expresa
Bid	Igual	Se activa por corte	Se activa por corte

### **DISCUSION.**

En este estudio se analizo el efecto de la DEX en la apoptosis inducida por cisplatino y el papel regulador de la familia Bcl-2 en este proceso.

Los glucocorticoides son de uso frecuente en clínica por su actividad antiinflamatoria y antiemética, se les ha asociado como inductores de la apoptosis sobre todo en células del sistema inmune tal como es el caso de los linfocitos (Amos y cols., 1998). Si bien en otros tipos celulares como los hepatocitos de rata estas hormonas tienen el efecto contrario, es decir, inhiben la apoptosis (Yamamoto y cols 1998). Las CGH han sido asociados tanto a la regulación de la proliferación de varios tipos celulares como a la inhibición del crecimiento. La adición de DEX a fibroblastos humanos produce un aumento en su proliferación (Li y cols, 1998) En contraste, en células de carcinoma de pulmón los glucocorticoides inhiben el crecimiento (Nagy y cols., 1998; Honma y cols., 1999).

En nuestro caso encontramos que la DEX inhibió el crecimiento de células HeLa y a su vez tuvo efecto protector contra la apoptosis inducida por el antineoplásico cisplatino. Esto coincide con algunos hallazgos en la literatura donde se menciona que en algunas neoplasias como los gliomas humanos la DEX produce resistencia a antineoplásicos, posiblemente inhibiendo la apoptosis (Rieger y cols., 1999; Haarman y cols, 1999). Esta inhibición fue dependiente del tiempo de pretratamiento y la concentración de DEX, en los experimentos de viabilidad se determinó que la protección frente a la apoptosis que confiere la DEX fue mas efectiva en la mayor concentración probada ( $1 \times 10^{-5} M$ ) y con el mayor tiempo de exposición (24 h), lo que coincide con el trabajo de Gorman y cols.(2000) quienes trabajaron con linfocitos.

Por otra parte en el análisis morfológico del tratamiento con BrEt se observaron los efectos duales de la DEX, tanto de inhibición de la apoptosis como de inhibición de la proliferación celular pues el conteo celular reportó un menor número celular respecto al control, pero a su vez se apreció la protección que otorgó el pretratamiento con DEX frente a la apoptosis inducida por cisplatino al notarse un menor número de núcleos condensados y fragmentados. En otras líneas de cáncer se ha encontrado que la DEX tiene este efecto protector contra la apoptosis: en células de gliomas y PC13 (Carollo y cols., 1998; Nauman y cols., 1998) en células de hepatoma de rata (Yamamoto y cols., 1998).

El mecanismo exacto por el cual los CGH modulan la apoptosis es desconocido actualmente.

Existen en la literatura diversos datos que sugieren la importancia de proteínas de la familia Bcl-2 en la modulación de la apoptosis por glucocorticoides. En algunos sistemas en los cuales la DEX causa apoptosis, ésta es inhibida si se sobre-expresa Bcl-2 (Benson y cols., 1998) (Ivanov y Nikolic-Zugic, 1998) (Brunet y cols., 1998). Su efecto inhibitor de apoptosis ha sido estudiado y se ha sugerido que la DEX bloquea el potencial de membrana mitocondrial ( Evans-Storms y Cidlowski, 2000).

Otros autores han sugerido que los niveles de Bcl-2 son críticos en la sensibilidad de las células a la DEX. Los datos obtenidos por Huang y cols. en 1999 trabajando con linfocitos muestran que la expresión de Bcl-2 puede cambiar la

sensibilidad de una célula a las CGH, así en células T humanas con bajos niveles de Bcl-2 la DEX induce apoptosis si bien en células con altos niveles de Bcl-2 la DEX tiene un papel protector para la apoptosis (Huang, 1999) (Montani y cols, 1999). En nuestro sistema las células HeLa están consideradas como células que expresan poco Bcl-2 sin embargo la DEX tiene un efecto protector contra la apoptosis lo cual no apoya los trabajos de estos 2 autores. Lo cual sugiere que no en todas las células los niveles de Bcl-2 determinan si la DEX produce o inhibe la apoptosis. En las células HeLa expuestas a DEX solo la expresión de la proteína Bcl-2 disminuyó ligeramente, posiblemente esto se deba a la disminución en la proliferación de esta línea celular ya que Bcl-2 ha sido también relacionado con la proliferación celular de algunas líneas de cáncer.

Los trabajos de Yamamoto y cols. (1998) y Gorman y cols. (2000) vinculan los tratamientos con DEX con un incremento drástico en la expresión de la proteína Bcl-X<sub>L</sub>, un miembro anti-apoptótico, en células de hepatoma de rata y células de glioma respectivamente (Yamamoto y cols, 1998; Gorman y cols., 2000) lo cual podría evitar la liberación del citocromo c de la mitocondria y de la subsecuente a activación de caspasas. Si bien Hafid Medhed y cols. (1999) demostraron que la DEX impide la inducción de Bcl-x<sub>L</sub> causada por DMSO (dimetil sulfóxido) en células de mieloma.

En las proteínas con actividad anti-apoptótica analizadas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> encontramos cambios pero estos no se asocian con el efecto protector de la DEX en el proceso apoptótico. Los resultados esperados eran un aumento en la expresión de los miembros anti-apoptóticos cuando las células HeLa se pretrataban con DEX, sin embargo los niveles de ambas proteínas disminuyeron con el pretratamiento con DEX, con cisplatino los niveles aumentaron y este cambio no se vio afectado con el tratamiento cisplatino/ DEX.

Al analizar también la expresión otra proteína de la familia de Bcl-2 con actividad anti-apoptótica, encontramos que la proteína Bag no interviene en este proceso apoptótico ya que los niveles basales encontrados en células testigo no se modificaron con la exposición a cisplatino, DEX o a ambos.

Se encontró que Bcl-x<sub>S</sub>, Bak, y Bid, todas proteínas pro-apoptóticas intervienen en el proceso apoptótico inducido por cisplatino. Permanecen activas o sobre expresadas en células pretratadas con DEX y expuestas posteriormente a cisplatino. Lo cual sugiere que este glucocorticoide sintético esta actuando corriente arriba de estas proteínas. Si fuese de otra manera los niveles de los miembros pro-apoptóticos disminuirían cuando las células HeLa son pretratado con DEX y aumentarían al ser expuestas solo a cisplatino.

Se encontró que en los casos de Bak y Bcl-x<sub>S</sub> aumentaron sus niveles en células expuestas a cisplatino y estos niveles se mantuvieron en las células expuestas a DEX mas cisplatino.

En el caso de la proteína Bid detectamos una proteína de 35 KDa en células testigo. En las células tratadas con cisplatino o cisplatino/DEX detectamos además de la proteína de 35 KDa la proteína activada de 25 KDa.

Encontramos que la protección de la DEX del proceso apoptótico inducido por cisplatino se asocia a cambios en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. En



células testigo con el anticuerpo usado para la detección de la proteína Bax se detectaron 3 isoformas: una de 24 KDa (alfa), otra de 16 KDa y otra de 15 KDa. Con el tratamiento de DEX solo se detectó la isoforma alfa. Y en células tratadas con cisplatino detectamos una disminución en la isoforma alfa y la aparición de una banda de 21 KDa. La detección de esta isoforma se asoció con el proceso apoptótico inducido por cisplatino, la expresión de esta isoforma fue reprimida por la DEX, por lo cual puede ser un blanco importante en la protección de la apoptosis por este glucocorticoide sintético.

Ya que la familia de Bcl-2 esta muy relacionada con el papel de la mitocondria durante la apoptosis y que encontramos diferencias en la expresión de la proteína Bax fue importante hacer el análisis de la expresión del citocromo c. Se encontró que la DEX protege parcialmente el daño de la mitocondria causada por el cisplatino ya que la cantidad de citósolico fue menor en células tratadas con DEX mas cisplatino que aquellas expuestas solo al cisplatino. Esta protección puede estar asociada a los cambios en la proteína Bax y/o a un efecto directo de la DEX sobre la mitocondria ya que Scheller y cols (2000) ha descrito que la mitocondria de las células HeLa presentan receptores para glucocorticoides sin embargo no se sabe si estos regulan la expresión de algún gen. Este es el primer trabajo en el cual se demuestra que estas 4 proteínas de la familia Bcl-2 con actividad pro-apoptótica se modifican durante el proceso apoptótico inducido por cisplatino y que interesantemente el efecto protector de la DEX esta asociado con un cambio en la expresión de una isoforma de la proteína Bax.

### CONCLUSIONES.

- 1) La DEX por si misma inhibió el crecimiento en células HeLa.
- 2) La DEX protegió a las células HeLa del proceso apoptótico inducido por el fármaco cisplatino de una manera dosis dependiente.
- 3) La DEX protegió a las células HeLa de la apoptosis de una manera tiempo dependiente.
- 4) Los miembros anti-apoptóticos analizados (Bcl-2, Bcl-xL y Bag) no intervinieron en la protección de la apoptosis mediada por DEX.
- 5) Los miembros pro-apoptóticos analizados (Bcl-xS, Bak, y Bid) intervienen en el proceso apoptótico inducido por cisplatino, pero no intervienen en la protección de la apoptosis por DEX.
- 6) La proteína pro-apoptótica Bax posee una isoforma que se activa por cisplatino y es reprimida por la DEX.

**BIBLIOGRAFIA.**

**Adams JM, Cory S** (1998) The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.

**Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK** (1998) Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* 54(5): 427-45. Review.

**Amos CL, Woetmann A, Nielsen M, Geisler C, Oldum N, Brown BL, Dobson PR** (1998) The role of caspase 3 and Bcl-xL in the action of interleukin 7 (IL-7): a survival factor in activated human T cells. *Cytokine* 10(9): 662-8.

**Barden WC, Gonsalus LG, Musto AN, Cheng YC, Reventos J, Smith CU, Hammond G** (1977) Corticosteroid binding globulin and androgen binding protein belong to protein families distinct from steroid receptor. *J. Steroid Biochem.* 252,1895-1897.

**Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY** (1997). Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 387(6632): 516-9.

**Benson RS, Dive C, Watson AJ** (1998) Comparative effects of Bcl-2 over-expression and ZVAD.FMK treatment on dexamethasone and VP16-induced apoptosis in CEM cells. *Cell Death Differ.* 5(5): 432-9.

**Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR** (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17(1): 37-49.

**Brunet CL, Gunby RH, Benson RS, Hickman JA, Watson AJ, Brady** (1998) Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ.* 5(1): 107-15.

**Cai J, Yang J, Jones DP** (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366(1-2): 139-49. Review.

**Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R** (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377(6544): 68-71.

**Carollo M, Parente L, D'Alessandro N** (1998) Dexamethasone-induced cytotoxic activity and drug resistance effects in androgen-independent prostate tumor PC-3 cells are mediated by lipocortin 1. *Oncel. Res.* 10(5): 245-54.

**Cidlowski JA, Cidlowsky NB** (1981) Regulation of glucocorticoid receptor by glucocorticoids in cultured HeLa S3 cells. *Endocrinology.* 109(6): 1975-82

**Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS** (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10:267-93. Review.

**Cosulich SC, Worrall V, Hedge PJ, Green S, Clarke PR** (1997) Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr. Biol.* 7(12): 913-20.

**Counis MF, Torriglia A** (2000) DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 78(4): 405-414.

**Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM** (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax like death effector by caspases. *Science* 278: 1996-1968.

- Chittenden T**, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO. J.* 1995;14(22):5589-96.
- D'Adamio F**, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Magliorati G, Riccardi C (1997) A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7(6) 803-12.
- Decaudin D**, Marzo I, Brenner C, Kroemer G (1998) Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy *Int. J. Oncol.* 12(1):141-52.
- De la Coste A**, Fabre M, McDonell N, Porteu A, Gilgenkrantz H, Perret C, Kahn A, Mignon A (1999) Differential protective effects of Bcl-xL and Bcl-2 on apoptotic liver injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol.* 277(3 Pt 1):G702-8.
- De Jong D**, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluijn PM (1994) Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res.* 54(1):256-60.
- Derfuss T**, Fickenscher H, Kraft MS, Henning G, Lengenfelder D, Fleckenstein B y Meinel E (1998) Antiapoptotic activity of the herpesvirus Saimiri-encoded Bcl-2 homolog: stabilization of mitochondria and inhibition of caspase-3- like activity. *J. Virol.* 72(7):5897.
- Dole MG**, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G, Castle VP (1995) Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55(12):2576-82.
- Dragovich T**, Rudin CM, Thompson CB (1998) Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17(25):3207-13. Review.
- Duke RC** (1992) Apoptosis in cytotoxic T lymphocytes and their targets. *Semin. Immunol.* 4(6):407-12. Review.
- Duke RC**, Ojcius DM y Young DE (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci. Amer.* 52:48-55.
- Ellis RE**, Yuan J y Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
- Evans-Storms RB**, Cidlowski JA (2000) Delineation of an anti-apoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor kB. *Endocrinology.* 141 (5):1854-1862.
- Fichtinger-Schepman AMJ**, van der Veer JL, den Hartog JHJ Lohman MPH y Reedijk J (1985) Adducts of the antitumor drug cis-Diamminedichloroplatinum (II) with DNA formation, identification and quantitation. *Biochemistry* 24:707-713
- Fulda S**, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (1998) Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 58(19): 4453-60.
- Gómez EO**, Zentella A (1997) Apoptosis y muerte celular programada. *BEB.* 17 (3):105-114

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Gonzalez S**, Coirini H, Gonzalez Denielle MC, Gonzalez S, Calandra R, De Nicola AF (1995) Time-dependent effects of dexamethasone on glutamate binding, ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in the transected spinal cord. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55(1):85-92.

**Gorman AM**, Hirt UA, Orrenius S, Ceccatelli S (2000) Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neuroscience* 96(2):417-25.

**Granner KDA**, Hargrove JL (1983) Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase: the relationship to mRNA TAT. *Mol. Cell Biochem.* 53 54 113-118.

**Green DR**, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.

**Gross A**, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO. J.* 17(14):3878-85.

**Gross A**, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 13: 1899-1911.

**Haarman EG**, Kaspers GJ, Pieters R, van Zantwijk CH, Broekema GJ, Hahlen K, Veerman AJ (1999) BCL-2 expression in childhood leukemia versus spontaneous apoptosis, drug induced apoptosis, and in vitro drug resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 457:325-33.

**Hacker G**, Vaux DL (1995) Apoptosis. A sticky business. *Curr. Biol.* 5(6):622-4. Review.

**Hafid-Medheb K**, Poindessous-Jazat V, Augery-Bourget Y, Hanania N, Robert-Lezenes J (1999) Bcl-xL induction during terminal differentiation of friend erythroleukaemia cells correlates with delay of apoptosis and loss of proliferative capacity but not with haemoglobinization. *Cell Death Differ.* 6(2):166-74.

**Higby DJ**, Wallace HJ, Albert D, Holland JF (1974) Diamminodichloroplatinum in the chemotherapy of testicular tumors. *J. Urol.* 112(1):100-4.

**Higby DJ**, Wallace HJ, Albert DJ, Holland JF (1974) Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer* 33(5):1219-5.

**Huang ST**, Cidlowsky JA (1999) Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *FASEB. J.* 13(3):467-76.

**Hockenbery D**, Nuñez G, Milliam C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336.

**Hockenbery DM**, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.

**Honma Y**, Yamamoto-Yamaguchi Y, Kanatani Y (1999) Vesnarinone and glucocorticoids cooperatively induce G1 arrest and have an anti-tumour effect on human non-small cell lung carcinoma cells grown in nude mice. *Br. J. Cancer* 80(1-2):96-103.

**Ivanov, VN**, Nikolic-Zugic J (1998) Biochemical and kinetic characterization of the glucocorticoid-induced apoptosis of immature CD4+CD8+ thymocytes. *Int. Immunol.* 10(12):1807-17.

**Jurgensmeier JM**, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(9):4997-5002.

**Kawamura A**, Tamaki N, Kokunai T (1998) Effect of dexamethasone on cell proliferation of neuroepithelial tumor cell lines. *Neurol. Med. Chir.* 38(10):633-40.

**Kelekar A**, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB (1997) Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-xL. *Mol. Cell Biol.* 17: 7040-7046.

**Kelekar A**, Thompson CB (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 8:324-330.

**Kerr JFR**, Wyllie AH y Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239.

**Kerr JFR**, Y Harmon BV (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. En: Apoptosis: the molecular basis of the cell death. Editores : David L Tomei y Frederick O Cope. Número 3, de la serie: *Current Communications in Cell and Molecular Biology*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp 5-29.

**Kim CN**, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K (1997) Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res.* 57(15):3115-20.

**Kobzdej M**, Matuszyk J, Ziolo E, Strzadala L (2000) Changes in glucocorticoid-induced apoptosis and in expression of Bcl-2 protein during long term culture of thymic lymphoma. *Arch. Immunol. The Exp.(Warsz)* 48 (1):43-6.

**Kroemer G** (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 6: 614-620.

**Kroemer G**, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:619-42 Review.

**Krumenacker JS**, Buckley DJ, Leff MA, McCormack JT, de Jong G, Gout PW, Reed JC, Miyashita T, Magnuson NS, Buckley AR (1998) Prolactin-regulated apoptosis of Nb2 lymphoma cells: pin-1, bcl-2 and bax expression. *Endocrine* 9(2):163-70.

**Kuwana T**, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S (1998) Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 273(26):16589-94.

**Li F**, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC (1997) Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 272(48):30299-305.

**Li S**, Mawal-Dewan M, Cristofalo VJ, Sell C (1998) Enhanced proliferation of human fibroblasts, in the presence of dexamethasone, is accompanied by changes in p21Waf1/Cip1/Sdi1 and the insulin-like growth factor type 1 receptor. *J. Cell Physiol.* 177(3): 396-401.

**Maldonado V**, De Anda J, Meléndez-Zajgla J (1996) Paclitaxel-Induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent. *J. Biochem. Toxicology.* 11:1-6.

**Maldonado V**, Meléndez J, Gonzalez H, Ortega A (1995) Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 691-696.

**Maldonado V**, Meléndez-Zajgla J, Ortega A (1997) Modulation of bcl-2, p53 and NFκB during cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. *Mutat. Res.* 381: 67-75.

**Marzo I**, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187(8):1261-71.

**Meléndez J**, Maldonado V (1998) Cisplatino. Avances recientes en el estudio de su mecanismo de acción. *Revista del instituto nacional de Cancerología* (44): 28-34.

**Mignotte B**, Vayssiere JL (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 252(1):1-15. Review.

**Minn AJ**, Boise LH, Thompson CB (1996) Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J. Biol. Chem.* 271(11):6306-12.

**Minn AJ**, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Vander Heiden MG, Chang BS, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1999) Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and independent mechanism. *EMBO J* 18: 632-643  
**Minn AJ**, Boise LH, Thompson CB (1996) Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J. Biol. Chem.* 271(11):6306-12.

**Montani MS**, Tuosto L, Gilliberti R, Stefanini L, Cundari E, Piccolella E (1999). Dexamethasone induces apoptosis in human T cell clones expressing low levels of Bcl-2. *Cell Death Differ.* 6(1):79-86.

**Moudgil VK**, Lombardo G, Eessalu T, Eliezer N (1986) Hormone dependency of transformation of rat liver glucocorticoid receptor in vitro: effects of heat, salt and nucleotides. *J. Biochem.* 99, 1005-1016.

**Nagy P**, Kiss A, Schnur J, Thorgerirsson SS (1998). Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. *Hepatology.* 28(2):423-9.

**Naumann U**, Durka S, Weller M (1998) Dexamethasone-mediated protection from drug cytotoxicity: association with WAF1/CIP1 protein accumulation?. *Oncogene* 17(12):1567-75.

**Nelson-Rees WA**, Hunter L, Darlington GJ, O'Brien SJ (1980) Characteristics of HeLa strains: permanent vs. Variable. *Cytogenet. Cell Genet.* 27(4):216-31. Review.

**Nguyen M**, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268: (34) 25265-25268.

**Okuno S**, Shimizu S, Ito T, Nomura M, Hamada E, Tsujimoto Y, Matsuda H (1998) Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 273(51):34272-7.

**Oltvai ZN**, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-19.

**Pasqualine RQ** (1973) *Endocrinología*. 6ª ed. Vol. III Ed. científico medica, México 674 pp.

**Peitsch MC**, Mannherz HT y Tschopp J (1994) The apoptosis endonucleases: cleaning after cell death?. *Trends Cell Biol.* 4:37-41.

**Perkins CL**, Fang G, Kim CN, Bhalla KN (2000) The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res.* 60(6):1645-53.

**Porter AG** (1999) Protein translocation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* (9):394-401.

**Reed JC** (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776.

**Reed JC** (1997) Bcl-2 Family Proteins: Strategies for Overcoming Chemoresistance in Cancer. *Advances in Pharmacology* 41, 501-513.

**Reed JC** (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17(25):3225-36. Review.

**Reed JC**, Jurgensmeier JM, Matsuyama S (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366(1-2):127-37.

**Riccardi C**, Cifone MG, Migliorati G (1999) Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GILZ and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ.* 6(12): 1182-9.

**Rieger J**, Durka S, Streffer J, Dichgans J, Weller M (1999) Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by antioxidants, BCL-2 and dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.* 1999 365(2-3):301-8.

**Rosse T**, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391(6666):496-9.

**Roberts JJ**, Thompson AJ (1979) The mechanism of action of anti-tumor platinum compounds. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 22:71-79.

**Rosenberg B**, VanCamp L, Grimley EB, Thompson J (1965) The inhibition of growth or cell division in *E. Coli* by electrolysis from platinum electrode. *Nature* 205:698-699.

**Samejima K**, Earnshaw WC, Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(17):7834-8.

**Samejima K**, Tone S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrieu F, Martins LM, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1998) Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J. Cell. Biol.* 143(1):225-39.

**Sheller K**, Sekeris CE, Krohne G, Hock R, Hansen IA, Scheer U (2000) Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79(5):299-307.

**Schimke RT**, Kung A, Sherwood SS, Sheridan J, Sharma R (1994) Life, death and genomic change in perturbed cell cycles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 345(1313):311-7. Review.

**Solary E** (1998) Apoptosis: molecular mechanisms. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 192(6):1065-76. Review. French.



**Sorenson CM**, Barry MA, Eastman A (1990). Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:749-755.

**Susin SA**, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M y Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1331-1341

**Susin SA**, Zamzami N, Kroemer G (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366(1-2):151-65. Review.

**Susin SA**, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor *Nature* 397(6718):441-6.

**Susin SA**, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189(2):381-94.

**Tsujimoto Y** (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes Cells* 3(11):697-707. Review.

**Thompson EB**, Lippman MC (1974) Mechanism of action of glucocorticoids. *Metabolism.* 23 159-202.

**Vaux DL** (1993) Toward understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:786-789.

**Vazquez-Padua MA** (1994) Modulation of thymidine kinase activity: a biochemical strategy to enhance the activation of antineoplastic drugs.

*P R Health Sci J.*13(1):19-23. Review.

**Velazquez M**, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J (1998) Cisplatin-induced Apoptosis of HeLa cells. Effect of RNA and protein synthesis inhibitors, Ca<sup>2+</sup> chelators and zinc. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 17,3:277-284.

**Yamamoto M**, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y (1998) Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor B1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL. *Hepatology* 27(4):959-66

**Young RC**, Von Hoff DD, Gormley P, Makuch R, Cassidy J (1979) Cis-dichloroplatinum (II) for the treatment of advanced ovarian cancer. *Cancer Treat. Rep.* 63:1539-1544.

**Yuan J**, Gu ZL, Chou WH, Kwok CY (1999) Elemene induces apoptosis and regulates expression of bcl-2 protein in human leukemia K562 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 20(2):103-6.

**Zakeri Z**, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA (1995) Cell death: programmed, apoptosis, necrosis or other?. *Cell Death and Differentiation* 2:87-96.

**Zha H**, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC (1996) Pro-apoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* ;271(13):7440-4.

**Zhu W**, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO. J.* 15(16): 4130-41.

## FE DE ERRATAS

### En la página 17 dice:

"A continuación se comparó la viabilidad de las células testigo con las células expuestas con cisplatino (40  $\mu\text{M}$ ) y con las células expuestas tanto a cisplatino (40  $\mu\text{M}$ ) tanto con un pretratamiento por 24 horas con DEX a diferentes concentraciones..."

### Debe decir:

"A continuación se comparó la viabilidad de las células expuestas 18 h a cisplatino (40  $\mu\text{M}$ ) con las células expuestas tanto a cisplatino (40  $\mu\text{M}$ ) como a un pretratamiento por 24 horas con DEX a diferentes concentraciones..."

### En la página 21 dice:

"...los niveles de Bcl-2 se mantuvieron iguales al pretratar células HeLa con DEX..."

### Debe decir:

"...los niveles de Bcl-2 disminuyeron al pretratar células HeLa con DEX..."

### En la página 23 dice:

Prot/Trat	DEX	CIS	CIS/DEX
Bcl-2	Disminuye	Aumenta	Aumenta
Bcl-XL	Aumenta	Aumenta	Aumenta
Bag	Igual	Igual	Igual
Bak	Igual	Aumenta	Aumenta
Bax	Igual	Aumenta, isoforma	Igual, desaparece isoforma
Bcl-xS	No expresa	Se expresa	Se expresa
Bid	Igual	Se activa por corte	Se activa por corte

### Debe decir:

Prot/Trat	DEX	CIS	CIS/DEX
Bcl-2	Disminuye	Aumenta	Igual
Bcl-xL	Aumenta	Aumenta	Disminuye
Bag	Igual	Igual	Igual
Bak	Igual	Aumenta	Aumenta
Bax	Igual	Aparece isoforma	Desaparece isoforma
Bcl-xS	No expresa	Se expresa	Se expresa
Bid	Igual	Se activa por corte	Se activa por corte