

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

**UDLAP**®

***“Revisión sobre el efecto de las desintegrinas de venenos de serpiente y su aplicación en el cáncer de pulmón: énfasis en el proceso de apoptosis”***

Tesis que, para completar los requisitos del programa de honores presenta la  
estudiante

Romina Cano Eddy

159174

Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo

Dra. Irene Vergara Bahena

San Andrés Cholula, Puebla

Otoño 2021

TESIS QUE, PARA COMPLETAR LOS REQUISITOS DEL PROGRAMA DE  
HONORES PRESENTA LA ESTUDIANTE ROMINA CANO EDDY, 159174

DIRECTOR DE TESIS



---

Dra. Irene Vergara Bahena

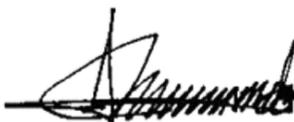
PRESIDENTE DE TESIS



---

Dra. Laura Verónica Plá

SECRETARIO DE TESIS



---

Dra. Jessica Noemi Mundo Ayala

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecer a mi tutora, la Dra. Irene Vergara Bahena por permitirme ser parte de su grupo de investigación denominado “*Snake*” para trabajar en el proyecto “*Búsqueda de moléculas con actividad farmacológica en veneno de animales*”. Gracias por compartirme un poco de sus conocimientos y su experiencia en el tema para poder realizar el trabajo correctamente. Agradezco eternamente su constante apoyo, sus retroalimentaciones, sus comentarios alentadores, y sobre todo, el tiempo y la confianza que invirtió en mí y en mi trabajo.

A la Universidad de las Américas Puebla, específicamente al Decanato de Investigación y Posgrado por permitirme formar parte del Programa de Honores UDLAP y así, trabajar junto con mi tutora en el proyecto de investigación.

A los integrantes del grupo “*Snake*” quienes me brindaron diversas fuentes de información para obtener el material bibliográfico necesario para mi tesis.

Al comité de sinodales por sus gratas aportaciones y por su participación.

A la tesis de la Lic. Paulina López Márquez, egresada de la Universidad de las Américas Puebla, por servirme como guía para el formato de mi trabajo de investigación.

A mis compañeros, maestros, amigos y familiares quienes me apoyaron incondicionalmente en todo momento, me motivaron y me dieron la confianza que necesitaba para creer en mí misma.

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme vivir este momento y, finalmente, me agradezco a mí por la disciplina, el esfuerzo y la perseverancia que me permitió llegar hasta aquí.

Estoy eternamente agradecida con cada uno de los que formaron parte de este proceso.

## **DEDICATORIA**

El desarrollo de mi tesis profesional está dedicada a mis padres quienes siempre me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado para cumplir lo que me propongo. No cabe duda que sin ellos y sin su esfuerzo no me hubiera sido posible estudiar la licenciatura en tan prestigiada universidad. Su apoyo incondicional es lo que me impulsa día a día para conseguir mis logros personales y que, se enorgullezcan tanto de mí como de lo que han logrado como padres. Es la mínima retribución que puedo hacer por todo lo que han hecho y por lo que me han dado.

Por último, quisiera dedicarle esta tesis a aquellas personas que no encuentran la motivación suficiente para concluir sus metas. Sé que a veces el camino puede ser complicado, pero ustedes son las únicas personas que podrán lograrlo, nadie más lo hará por ustedes. Y, una vez que finalicen, se darán cuenta de tan grata sensación de satisfacción por haber concluido su meta.

# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	7
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
<b>5.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
5.1	CÁNCER .....	8
5.1.1	<i>Epidemiología del cáncer en el mundo y en México.</i> .....	9
5.1.2	<i>Cáncer de pulmón</i> .....	12
5.1.3	<i>Cómo detectar el cáncer de pulmón</i> .....	14
5.1.4	<i>Terapias actuales contra el cáncer de pulmón</i> .....	16
5.2	VENENOS Y SUS COMPONENTES .....	17
5.2.1	<i>Veneno de <i>Crotalus polystictus</i></i> .....	19
5.3	DESINTEGRINAS.....	25
5.3.1	<i>Estructura</i> .....	26
5.3.2	<i>Clasificación</i> .....	26
5.3.3	<i>Actividad anticancerígena</i> .....	28
5.3.4	<i>Integrinas y el cáncer</i> .....	31
5.3.5	<i>Relación entre las desintegrinas de venenos de serpiente y el cáncer.</i> .....	34
5.4	TIPOS DE MUERTE CELULAR: APOPTOSIS Y NECROSIS.....	48
5.4.1	<i>Apoptosis, aspectos moleculares que la caracterizan y su relación con el cáncer</i> .....	48
5.4.2	<i>Fase inductora</i> .....	50
5.4.3	<i>Fase efectora</i> .....	55
5.4.4	<i>Fase de degradación</i> .....	56
5.4.5	<i>Necrosis</i> .....	59
5.4.6	<i>Necrosis y su relación con el cáncer</i> .....	61
<b>6.</b>	<b>TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE APOPTOSIS</b> .....	<b>62</b>
6.1	ENSAYO DE TUNEL .....	63
6.1.1	<i>Técnica del ensayo de TUNEL</i> .....	64
6.1.2	<i>Ventajas y desventajas del Ensayo de TUNEL</i> .....	67
6.1.3	<i>Componentes para el ensayo de TUNEL</i> .....	67
6.2	ANEXINA V.....	69
6.2.1	<i>Componentes y procedimiento para el ensayo con anexina V</i> .....	71
6.2.2	<i>Ventajas y desventajas</i> .....	73
6.3	DETECCIÓN DE LAS CASPASAS .....	74
6.3.1	<i>Formas de medir los niveles de activación de las caspasas</i> .....	75
6.3.2	<i>Ventajas y desventajas</i> .....	77
6.4	EVIDENCIA DEL FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO DE TUNEL, ANEXINA V Y DETECCIÓN DE CASPASAS CON DESINTEGRINAS. ....	78
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La apoptosis es la muerte celular programada que permite eliminar células con mutaciones genéticas irreversibles en su ADN, así como, cuando un virus ha infectado una célula o cuando se requiere un equilibrio en la proliferación celular. Al ser la apoptosis un mecanismo molecular indispensable para eliminar células que promuevan un daño al organismo, dicho proceso se ha propuesto como blanco terapéutico para erradicar el cáncer. Las células cancerosas inhiben la apoptosis debido a su alta capacidad proliferativa y la activación de vías que promueven la sobrevivencia, por esto, la búsqueda de moléculas pro-apoptóticas sigue siendo atractiva para encontrar nuevos tratamientos contra el cáncer.

A lo largo de las últimas décadas han surgido diversas investigaciones que demuestran el potencial terapéutico de los componentes de venenos de serpientes para tratar diferentes enfermedades, incluido el cáncer. Los venenos de serpiente son una mezcla compleja de diferentes componentes que incluyen péptidos, proteínas, enzimas, carbohidratos y minerales (L.A. Calderón, *et. al*, 2014). Entre las enzimas que se han identificado en los venenos, se pueden encontrar acetilcolinesterasas, L-aminoácidos oxidadasas, serinaproteasas, metaloproteasas y fosfolipasas A2 (L.A. Calderón, *et. al*, 2014). Las desintegrinas son péptidos de bajo peso molecular que se encuentran en baja proporción en los venenos de algunas especies de serpientes, estos péptidos se unen con alta afinidad a las integrinas localizadas en la superficie celular. Las integrinas son una superfamilia de glucoproteínas que participan en la unión y comunicación celular con la matriz extracelular; se ha reportado que intervienen en los procesos de angiogénesis, crecimiento y señalización de tumores, por lo cual, son un blanco terapéutico muy prometedor (D. Vivas, R. Inga, A. Yarlequé, 2012).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. México no se exenta de esta situación, ya que, día con día los casos de cáncer siguen aumentando sin importar la edad, la raza o el sexo. A su vez, el cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más agresivos e invasivos que existe, provocando que la esperanza de vida en los pacientes se vea reducida. Si bien, existen diversos tratamientos que se ocupan actualmente para tratar este tipo de cáncer, no obstante, suelen provocar efectos secundarios negativos que afectan la calidad de vida de los consumidores. Además, algunos de estos tratamientos son invasivos y requieren de intervención quirúrgica. El desarrollo de nuevos tratamientos a partir de nuevas moléculas puede ser una puerta de esperanza para la obtención de nuevas terapias que ayuden a combatir el cáncer, pero, que también minimicen estos efectos secundarios. Asimismo, puede ser posible que el uso de estas nuevas terapias como coadyuvantes a las ya existentes resulten en una mayor efectividad reduciendo la metástasis y provocando la apoptosis en las células cancerígenas.

## **3. HIPÓTESIS**

El estudio y análisis de la muerte celular causada por las desintegrinas aisladas del veneno de serpientes ayudará a comprender su mecanismo de acción y su potencial farmacológico en el tratamiento del cáncer de pulmón.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

- Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el cáncer de pulmón, la apoptosis y el potencial terapéutico de las desintegrinas de venenos de serpiente.

## 4.2 Objetivos Particulares

- Investigar las bases moleculares y celulares del cáncer, con énfasis en el cáncer de pulmón.
- Investigar, describir y analizar los posibles tipos de muerte celular como consecuencia del tratamiento con desintegrinas, con base en reportes previos de desintegrinas aisladas de venenos de serpientes.
- Investigar y describir las técnicas experimentales comunes que se utilizan para estudiar la apoptosis y necrosis.
- Analizar los pros y contras de los métodos descritos para el estudio de la muerte celular en condiciones controladas.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Cáncer

Para comenzar, es esencial definir algunos conceptos básicos para una mejor comprensión del tema en general. Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer se define como *“un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo”* (OMS, 2020). Esta enfermedad es caracterizada por la presencia de células dañadas que han sufrido alteraciones en su ciclo celular y, por lo tanto, sus mecanismos de control de la división celular están dañados, permitiendo que se dividan exponencialmente en un periodo de tiempo más corto que las células normales (Cancer.Net, 2019). Adicionalmente, estas células cancerígenas tienen la habilidad de invadir órganos y tejidos que se encuentran a su alrededor, lo que se conoce como infiltración. Sin embargo, también tienen la posibilidad de trasladarse y proliferar a otras partes del organismo que se encuentren más alejadas, a lo que llamamos metástasis (Cancer.Net, 2019).

El cáncer puede desarrollarse en cualquier persona sin importar el sexo, la raza ni la edad; así pues, los síntomas, tratamientos y evolución son diferentes para cada individuo. Además, su desarrollo depende tanto de factores ambientales, de los hábitos de la persona y de las alteraciones genéticas y factores hereditarios. Se ha comprobado que mantener buenos hábitos de vida como, por ejemplo, el uso moderado del alcohol, no fumar, una dieta equilibrada y el ejercicio físico ayudan a prevenir el cáncer (OMS, 2020).

A la fecha, se han identificado varios tipos de cáncer de los cuales la gran mayoría tienen cura, dependiendo del estadio en el que se encuentre el paciente (National Cancer Institute, s.f). No obstante, el cáncer siempre se ha considerado una enfermedad compleja, multifacética y multidimensional en su impacto, añadiendo que en general el cáncer es una de las principales causas de muerte alrededor de todo el mundo (OMS, 2021).

### ***5.1.1 Epidemiología del cáncer en el mundo y en México.***

A nivel mundial, el cáncer es la primera causa de muerte con aproximadamente 18 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes anuales, de las cuáles el 70% se registran en países con ingresos medios y bajos (A. Meneses, *et. al.*, 2019). Dentro de los cinco principales tipos de cáncer que causaron el mayor número de fallecimientos en el año 2020 se encuentran: el cáncer de pulmón, con un total de 1.6 millones de defunciones; el hepático, con 788,000 defunciones; el colorrectal, con 774,000 muertes; el gástrico, con 754,000 y, el cáncer de mama con 571,000 defunciones (Organización Mundial de la Salud, 2018). En cuanto al número de casos de cáncer registrados en el 2020, se observa que el cáncer de mama es el de mayor incidencia dentro de la población mundial, seguido del cáncer de pulmón, colorrectal, próstata, estómago, entre otros. Dichas cifras se muestran a continuación en el Gráfico 1 (GLOBOCAN, 2020)

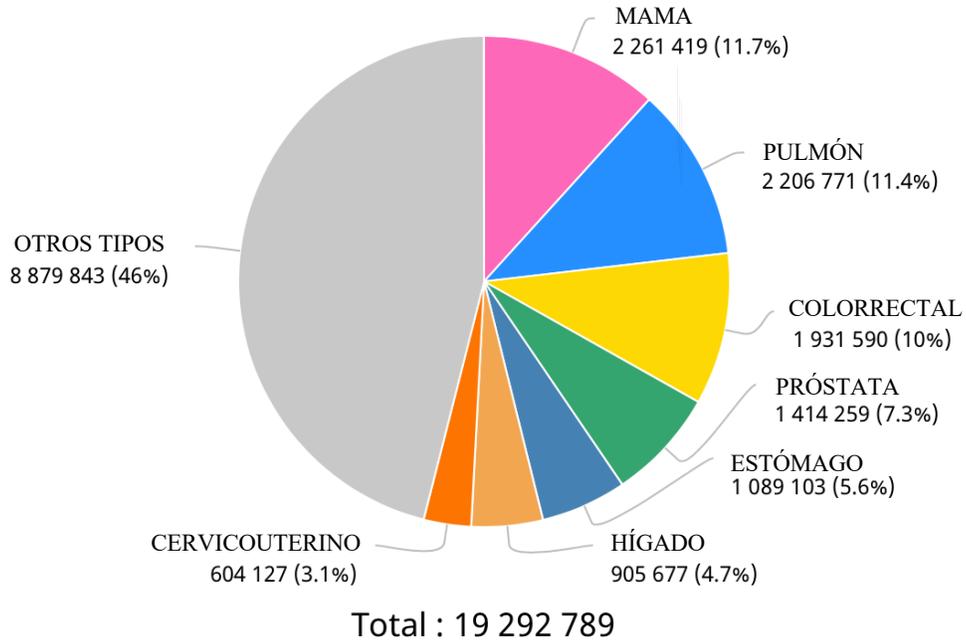


Gráfico 1. Número estimado de casos nuevos en el 2020 de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial, incluyendo ambos sexos y todas las edades. Modificado de: (GLOBOCAN, 2020).

Por otro lado, hasta febrero del 2020, el cáncer se identificó como la segunda causa de muerte en el continente americano. Hasta el 2018, fueron diagnosticados aproximadamente un total de 3.8 millones de casos y 1.4 millones de muertes. Dentro de los tipos de cáncer que se identificaron con mayor frecuencia en los hombres fueron el de próstata con un 21.7%, pulmón con un 9.5% y colorrectal con un 8.0%. Por otro lado, los más comunes dentro de la población femenina fueron el de mama con un total de 25.2%, de pulmón con un 8.5% y colorrectal con 8.2%. Las cifras estiman que, si no se toma acción contra estas enfermedades, para el 2030 el número de personas diagnosticadas aumentará un 32%, por lo que, más de 5 millones de personas desarrollarán algún tipo de cáncer (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

En México, el cáncer ocupa el tercer lugar de causa de muerte después de enfermedades cardiovasculares y diabetes. Se ha identificado que por cada 100 defunciones, 14 son provocadas por algún tipo de cáncer, asimismo, se estimó que entre el 2000 y el 2013 únicamente el cáncer de pulmón provocó un aproximado de 6,678 muertes anuales (Mohar-Betancourt, A, *et. al.*, 2017). En la Tabla 1 se puede observar los principales tipos de cáncer causantes de la mortalidad de hombres y mujeres mexicanos entre los años 2000 y 2013,

donde se logra apreciar que la incidencia del cáncer de pulmón tiende a ser mayor en hombres que en mujeres. En países como Japón, Corea del Sur, EEUU, Francia, Alemania e Italia, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte. Dado que, para el 2018 se registraron más de 2 millones de casos, los cuales afectaron en un 14.5% a hombres y en un 8.4% a mujeres. Por tanto, el cáncer de pulmón ocasionó un total de 1 millón 700 mil casos dejando sobrevivir únicamente al 18.4% de los pacientes que sufrían por dicha enfermedad (A. Meneses, *et. al.*, 2019).

Tabla 1. A) Principales causas de mortalidad por cáncer en hombres mexicanos (2000-2013). B) Principales causas de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (2000-2013). Modificado de: (Mohar-Betancourt, A, *et al.*, 2017).

A)

Tasa de Mortalidad al año														
Tipo de cáncer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Próstata	7.76	8.02	8.33	8.96	8.72	9.15	8.85	9.25	9.48	9.49	9.87	10.02	10.34	10.19
Pulmón	8.53	8.75	8.97	8.95	8.84	9.12	8.52	8.22	8.16	8.00	7.87	7.58	7.21	7.20
Estómago	5.40	5.14	5.25	5.27	5.20	5.16	5.21	5.14	5.23	5.21	5.19	4.94	5.00	4.82
Hígado	2.55	2.51	2.65	2.72	2.79	2.81	2.90	2.70	2.63	2.81	2.89	2.82	2.88	2.84
Cólon	1.96	1.99	2.04	2.15	2.23	2.46	2.50	2.55	2.94	2.79	2.85	3.00	3.38	3.51
Páncreas	2.00	2.09	2.24	2.22	2.31	2.32	2.41	2.54	2.70	2.71	2.59	2.51	2.82	2.62
Riñón	1.43	1.49	1.52	1.79	1.66	1.75	1.79	1.90	1.89	1.80	2.05	2.16	1.95	2.10
Linfoma no Hodgkin	1.48	1.42	1.68	1.49	1.72	1.71	1.68	1.77	1.82	1.79	1.69	1.87	1.85	1.72
No específico	1.51	1.48	1.57	1.46	1.56	1.53	1.53	1.66	1.70	1.71	1.76	1.76	1.75	1.73
Leucemia aguda linfoblástica	1.35	1.34	1.46	1.49	1.44	1.48	1.48	1.50	1.58	1.65	1.53	1.61	1.65	1.62
Total	57.14	57.62	60.16	61.44	61.66	63.70	63.33	64.36	66.49	67.23	68.84	69.61	71.74	65.56

B)

Tasa de Mortalidad al año														
Tipo de cáncer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Mama	6.77	6.93	7.33	7.28	7.71	7.71	8.04	8.21	8.48	8.50	8.65	8.81	9.36	8.94
Cervical	9.00	8.66	8.20	8.07	7.82	7.79	7.42	7.16	7.07	7.08	6.72	6.58	6.37	6.21
Estómago	4.32	4.42	4.46	4.44	4.45	4.54	4.40	4.34	4.41	4.29	4.36	4.41	4.24	4.16
Pulmón	3.92	3.87	4.07	4.00	4.13	4.06	4.12	4.01	3.96	3.94	4.04	4.08	3.72	3.94
Hígado	2.94	3.06	2.97	3.04	3.09	3.01	3.18	2.94	3.02	3.18	3.06	2.97	2.99	3.04
Ovario	2.26	2.43	2.54	2.63	2.68	2.73	2.96	2.95	2.97	3.03	3.16	3.39	3.33	3.41
Páncreas	2.23	2.23	2.39	2.37	2.42	2.47	2.51	2.72	2.83	2.82	2.83	2.86	2.85	2.96
Colon	1.96	2.13	2.01	2.27	2.33	2.41	2.39	2.62	2.62	2.34	2.48	2.58	2.96	3.10
No específico	1.58	1.57	1.64	1.63	1.59	1.61	1.59	1.72	1.75	1.84	1.80	1.68	1.65	1.76
Linfoma no Hodgkin	1.08	1.14	1.22	1.30	1.16	1.25	1.32	1.37	1.35	1.41	1.36	1.44	1.50	1.34
Total	60.22	60.66	61.51	62.18	63.23	64.16	64.93	65.71	66.75	67.80	68.94	69.94	70.70	64.71

### 5.1.2 *Cáncer de pulmón*

El cáncer de pulmón se desarrolla cuando las células presentes en los pulmones se alteran y comienzan a crecer de forma descontrolada formando una masa la cual se puede denominar tumor, lesión o nódulo. Un tumor puede ser maligno, lo que significa que puede crecer y diseminarse a otras partes del cuerpo. Existen también los tumores benignos los cuales pueden crecer, pero no se diseminan (Cancer.Net, 2019). Generalmente, este cáncer comienza a desarrollarse en las células que revisten los bronquios, bronquiolos o alveolos. Estos últimos son los encargados de “absorber” el oxígeno del aire exterior que ingresa a nuestro organismo mediante la inhalación y realizar el intercambio de gases para eliminar el dióxido de carbono de nuestra sangre mediante la exhalación. Este tipo de cáncer es uno de los más comunes, por lo que, se podría decir que, en todo el mundo, el cáncer de pulmón es la neoplasia maligna más común y el causante del mayor número de muertes en las últimas décadas (Wong, M, *et.al.*, 2017). Por eso, es indispensable que se realicen trabajos de investigación que ayuden a comprender a fondo la complejidad de la enfermedad y encontrar las terapias más eficientes para poder salvar el mayor número de vidas posible. De acuerdo a la observación de las células bajo el microscopio, este tipo de cáncer se divide en dos tipos.

El primer tipo es el cáncer de pulmón de células no pequeñas o NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) por sus siglas en inglés, el cual representa del 80-85% de los cánceres de pulmón (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2019). Dentro de esta clasificación se encuentra el adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma representa el subtipo histológico dominante entre los otros tipos de cáncer de pulmón y se origina en las células del pulmón que constituyen el revestimiento interno de las glándulas secretoras de moco a la luz glandular, por tanto, se encuentra en las partes externas de este órgano lo que permite que pueda ser detectado antes de que se disemine (T. Zamay, *et.al.*, 2017). Se ha observado que el adenocarcinoma es más común en mujeres que en los hombres y, también, ocurre con mayor frecuencia en personas más jóvenes en comparación con otros tipos de cáncer. Este tipo de cáncer se presenta en personas fumadoras o exfumadoras, sin embargo, también es el más común en aquellas personas no

fumadoras. Continuando con los subtipos, está el carcinoma de células escamosas que se origina en las células epiteliales planas que cubren todo el interior de las vías respiratorias, pero tiende a desarrollarse en los bronquios, principalmente cuando el paciente tiene antecedentes de tabaquismo. Por otro lado, está el carcinoma de células grandes el cual es una capa heterogénea de células de músculo liso y se ha observado que logra desarrollarse en cualquier parte de los pulmones, pero principalmente en las células epiteliales del pulmón. Es característico por tener un crecimiento y una propagación rápida, lo que hace más difícil su tratamiento, un ejemplo es el carcinoma neuroendocrino de células grandes (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2019). Este último tipo de cáncer de pulmón es un grupo heterogéneo de varias neoplasias malignas indiferenciadas que carecen de características citológicas y arquitectónicas de las células pequeñas y diferenciación glandular o escamosa (T. Zamay, *et.al.*, 2017).

El segundo tipo de cáncer de pulmón es el cáncer de células pequeñas (CPCP), este sólo engloba alrededor del 10 al 15% de todos los cánceres de pulmón. Aunque su prevalencia es mucho más baja, en comparación con el NSCLC, se ha identificado que este cáncer es más difícil de controlar debido a que evoluciona rápidamente y, por eso, en el 70% de las personas con este cáncer se detecta cuando ya se ha propagado, añadiendo que, una vez que sea eliminado es muy probable que vuelva a desarrollarse en algún momento de la vida del paciente. Una de las ventajas es que suele responder muy bien a la quimioterapia y a la radioterapia (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2019). A continuación, en la Figura 1 se logran apreciar los diferentes tipos de cáncer de pulmón anteriormente mencionados.

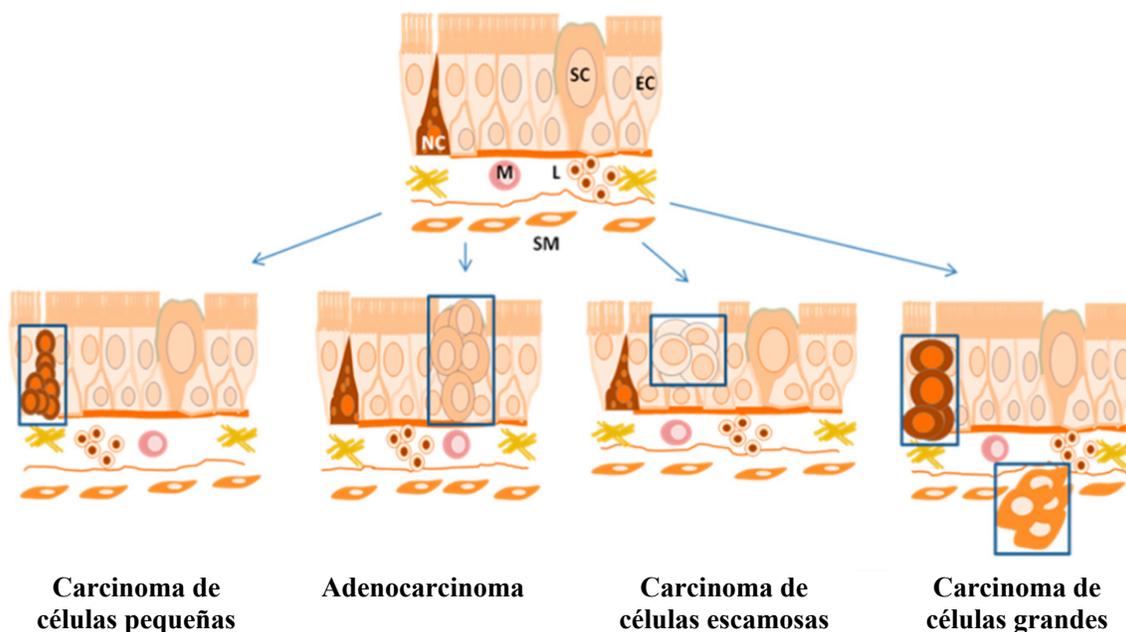


Figura 1. Histogénesis de tipos histológicos de cáncer de pulmón. SM: músculo liso; M: macrófago; L: linfocito; NC: célula neuroendocrina; EC: célula epitelial; SC: célula secretora. Modificado de: (T. Zamay, et.al., 2017).

### 5.1.3 Cómo detectar el cáncer de pulmón

Para la detección correcta de cualquier tipo de cáncer es indispensable un buen diagnóstico. Actualmente, existen diversas pruebas para diagnosticar el cáncer de pulmón, se recomienda ampliamente que se realicen más de una prueba diagnóstica para la confirmación del padecimiento y evitar un falso positivo o falso negativo. Las pruebas recomendadas para diagnosticar el cáncer de pulmón en México se mencionan a continuación (Gobierno de México, 2020):

- **Estudios por imágenes:** utilizan ondas sonoras, rayos X, campos magnéticos o sustancias radioactivas para obtener imágenes del interior del cuerpo.
- **Radiografía de tórax:** es a menudo la primera prueba que su médico pedirá para buscar la presencia de masas o manchas en los pulmones.
- **Tomografía computarizada (CT):** estudio donde se usan rayos X para producir imágenes transversales detalladas del cuerpo. Puede proporcionar información precisa sobre el tamaño, forma y posición de cualquier tumor. Además, ayuda a identificar ganglios linfáticos agrandados que pudieran contener cáncer, el cual, pudo haber propagado desde el pulmón.

- **Biopsia con aguja guiada por CT:** en los casos en que un área sospechosa de cáncer se encuentra profunda dentro del cuerpo, se puede usar una tomografía computarizada para guiar con precisión la aguja de una biopsia hacia el área sospechosa.
- **Imágenes por resonancia magnética:** proveen imágenes detalladas de los tejidos blandos del cuerpo. Sin embargo, la resonancia utiliza ondas de radio e imanes potentes en lugar de rayos X.
- **Tomografía por emisión de positrones:** conlleva inyectar una forma de azúcar radioactiva (conocida como fluordesoxiglucosa o FDG) en la sangre. Las células cancerosas crecen aceleradamente en el cuerpo, por lo que, absorben grandes cantidades del azúcar radiactivo. Después de aproximadamente una hora se captura una fotografía con una cámara especial, la cual, muestra las áreas de radioactividad en el cuerpo.
- **Gammagrafía ósea:** este estudio puede ayudar a mostrar si el cáncer ha hecho metástasis (propagación) en los huesos.
- **Broncoscopia:** estudio que se puede usar para encontrar un tumor de pulmón o para tomar una muestra de un tumor y saber si es cáncer.
- **Ecografía endobronquial:** tipo de estudio por imágenes que usa ondas sonoras para crear imágenes del interior del cuerpo. Esta prueba se puede emplear si el médico está considerando una cirugía como parte del tratamiento. Resulta mucho más útil para clasificar por etapas el cáncer de pulmón no microcítico.
- **Ecografía endoscópica esofágica:** similar a la ecografía endobronquial, con la excepción que el médico pasa un endoscopio (telescopio flexible con una fuente de luz) por la garganta hasta el esófago.
- **Mediastinoscopia y mediastinotomía:** procedimientos realizados para observar más directamente las estructuras en el mediastino (área entre los pulmones) y tomar muestras de éstas.
- **Toracentesis:** se realiza para aliviar síntomas causados por la acumulación de líquido alrededor de los pulmones (derrame pleural) y para saber si la acumulación de líquido es causada por la propagación del cáncer al revestimiento de los pulmones (pleura).
- **Toracoscopia:** procedimiento para determinar si el cáncer se ha propagado al espacio entre los pulmones y la pared torácica, o a los revestimientos de estos espacios.

- **Aspiración y biopsia de la médula ósea:** pruebas para determinar si hay propagación del cáncer en la médula ósea.
- **Pruebas de tejido y de células:** los síntomas y los resultados de los estudios por imágenes pueden sugerir de forma contundente la presencia de cáncer de pulmón, pero el diagnóstico real de cáncer de pulmón se hace al observar las células del pulmón bajo el microscopio.
- **Citología del esputo:** se observa una muestra de esputo (mucosidad que al toser sale de los pulmones) en un microscopio para determinar si existen células cancerosas.
- **Biopsia por aspiración con aguja fina:** biopsia con aguja para obtener una muestra pequeña de células de un área que luce sospechosa.
- **Análisis de sangre:** no se usan para diagnosticar el cáncer de pulmón, aunque a menudo se hacen para obtener una percepción de la salud general de la persona y para ayudar a determinar si el cáncer se ha propagado a otras áreas.
- **Pruebas de la función pulmonar:** se pueden hacer después del diagnóstico del cáncer de pulmón para analizar qué tan bien funcionan los pulmones.

#### ***5.1.4 Terapias actuales contra el cáncer de pulmón***

El tratamiento para el cáncer de pulmón dependerá de varios factores como: la edad, etapa de avance del cáncer, tipo de cáncer, estado de salud del paciente, sexo, histología, grado de metástasis en el cerebro, hemoglobina y creatinina al diagnóstico (Tabchi. S, *et.al.*, 2017). No obstante, para el tipo de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) se recomienda utilizar quimioterapia o en algunos casos radioterapia debido a la buena respuesta que muestra este cáncer ante tales tratamientos. En caso de que el cáncer sea detectado en estadio temprano también se puede eliminar mediante cirugía, complementando con quimioterapia y radioterapia (American Thoracic Society, 2014). En cuanto al tratamiento para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), dependerá de la etapa de la enfermedad en la que el paciente se encuentre, siempre tomando en cuenta cuál es la mejor opción para esa persona. Estos tratamientos pueden incluir cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida, siendo esta última medicamentos que se dirigen específicamente a los factores de crecimiento del tumor para evitar que las células sigan dividiéndose y que el cáncer continúe

evolucionando, es una terapia nueva para el cáncer de pulmón (American Thoracic Society, 2014). En la Tabla 2 se muestran las mejores opciones de tratamiento para este tipo de cáncer de acuerdo al estadio del paciente.

Tabla 2. Representa las opciones que un paciente con cáncer de tumor tiene para tratarlo, esto dependiendo de la etapa de evolución del cáncer en que se encuentre. Modificado de: (American Thoracic Society, 2014).

Etapa	Tipo de Tratamiento
I	Cirugía. En caso de no ser candidato, radioterapia.
II	Cirugía con quimioterapia antes o después. En caso de no ser candidato, radioterapia y quimioterapia.
III	Combinación de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.
IV	Quimioterapia, radioterapia (como tratamiento paliativo) para reducir el dolor u otros síntomas que afectan la calidad de vida, terapias dirigidas.

## 5.2 Venenos y sus componentes

La diversidad biológica que existe en México ha permitido la investigación y desarrollo de moléculas contra el cáncer a partir de recursos biológicos naturales, entre ellos los venenos de animales. Los venenos de las serpientes son secreciones complejas producidas en glándulas cefálicas especializadas y compuestas por una mezcla de diferentes componentes que incluyen péptidos, proteínas, enzimas, carbohidratos y minerales. Generalmente, las proteínas del veneno se clasifican en 10 a 15 familias, por ejemplo, para las serpientes de cascabel, son predominantemente las L-aminoácidos oxidasas (LAAO), fosfodiesterasas (PDE), metaloproteinasas (SVMP), serinaproteasas (SVSP), fosfolipasas A2 (PLA2), homólogos de miotoxina A no enzimática, desintegrinas, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP) y lectinas de tipo C (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018). Varios de estos compuestos con comunes de venenos de animales como serpientes, arañas, escorpiones, orugas, abejas, insectos, avispas, ciempiés, hormigas, sapos y ranas, los cuales, han sido estudiados y utilizados con fines farmacológicos y biotecnológicos para crear nuevas terapias contra diversas enfermedades (L.A. Calderon, *et.al.*, 2014).

En este proyecto, nos enfocamos en el uso de venenos como terapia contra el cáncer, específicamente el de pulmón. Entrando más en detalle, los primeros estudios publicados sobre el uso de venenos de serpiente contra células tumorales se obtuvieron de la especie *Agkistrodon rhodostoma*. De esta se logró extraer un péptido el cual se administró junto con ciclofosfamida, para así, producir desfibrinación y disminuir el peso del tumor por fibrinólisis y contribuir al desprendimiento y disminución de la diseminación del tumor (W. D. DeWys, H. C. Kwaan, and S. Bathina, 1976).

En la literatura se han reportado diferentes toxinas que pueden interferir en algunos procesos fisiológicos para permitir que el cáncer progrese, tal como se muestra en la Figura 2. Por ejemplo, las desintegrinas se han estudiado como bloqueadores de la metástasis (proceso que depende ampliamente de la adhesión, migración, interacción con el tejido blanco, invasión de vasos sanguíneos y linfáticos y, la salida del vaso). Para lograr este bloqueo, se analizó un inhibidor de integrinas, las cuales son una clase importante de receptores de superficie celular, críticamente involucradas en las interacciones célula-célula y célula-matriz y, además, juegan un importante papel en la invasión y diseminación tumoral. Particularmente, la desintegrina conocida como contortostatina del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, demostró ser un potente inhibidor de la adhesión mediada por la integrina  $\beta 1$  en células de melanoma metastásico humano (S. Yang, M. Lu, C. Chien *et. al.*, 2005). A lo largo del tiempo se han estudiado los mecanismos de acción de los diferentes compuestos de venenos de serpientes. Por ejemplo, se ha observado que, la cardiotoxina induce la apoptosis en células K562 mediante una vía de disfunción mitocondrial independiente de ROS y el mecanismo dependiente de caspasa de la relación Bax / Bcl-2 en cáncer colorrectal humano. Por otro lado, se ha comprobado que el veneno de serpiente inhibe altamente la formación de ácidos nucleicos en los tejidos del cáncer de mama, ayudando a disminuir la proliferación celular y suprimir este cáncer (H. Juhl, *et.al.*, 1990).



Figura 2. Acciones desencadenadas por venenos y / o toxinas de serpientes que provocan un efecto antitumoral. Modificado de: (L.A. Calderon, *et.al.*, 2014).

Existe una amplia diversidad de venenos o toxinas que posiblemente contribuyan al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer, ya que, precisamente el veneno de serpiente posee un amplio espectro de actividades biológicas. (L.A. Calderon, *et.al.*, 2014). Las desintegrinas provenientes del veneno de serpientes representan a un grupo de moléculas con diferentes estructuras, con potencial para el desarrollo de agentes anti-metastásicos y anti-angiogénicos. Las desintegrinas se retomarán detalladamente más adelante.

### 5.2.1 Veneno de *Crotalus polystictus*

Las serpientes son miembros del segundo grupo más específico de reptiles vivientes, estando arraigadas en la filogenia del lagarto. La evolución de la falta de extremidades es muy común en los lagartos, incluidas las serpientes, han evolucionado de forma independiente al menos 25 veces (Wiens, *et. al.* 2006).

En cuanto a la clasificación, todas las serpientes pertenecen al clado *Serpentes*, miembro del orden *Squamata*, mismo donde se encuentran los lagartos y otras especies similares. A su vez, el suborden *Serpientes* se subdivide en dos infraórdenes y en 25 familias las cuales se muestran a continuación (R.A Pyron, *et.al.*, 2013).

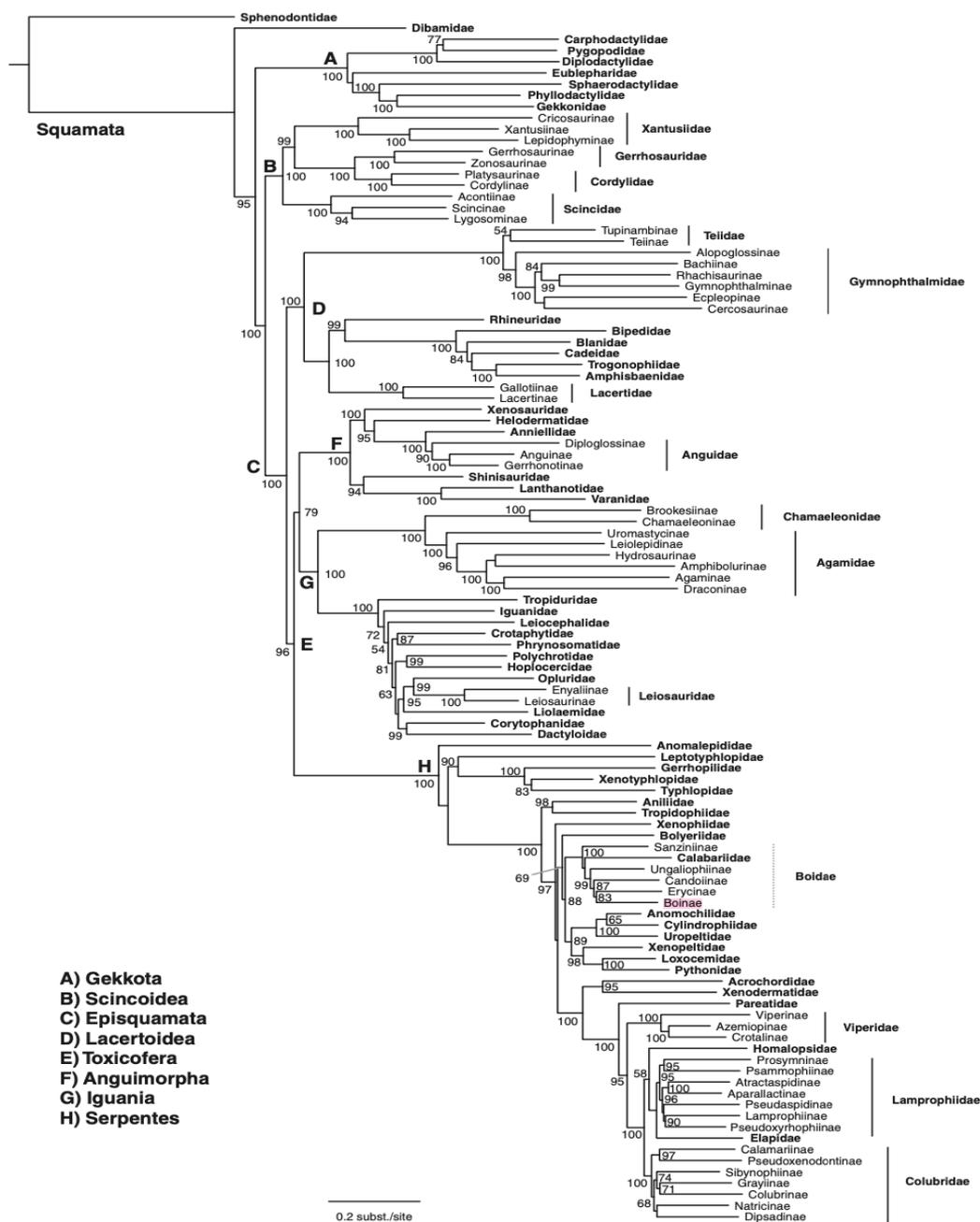


Figura 3. Filogenia escamosa de nivel superior. Representación esquelética del árbol de 4161 especies a partir del análisis de máxima verosimilitud de 12 genes, con puntas que representan familias y subfamilias (R.A Pyron, *et.al.*, 2013).

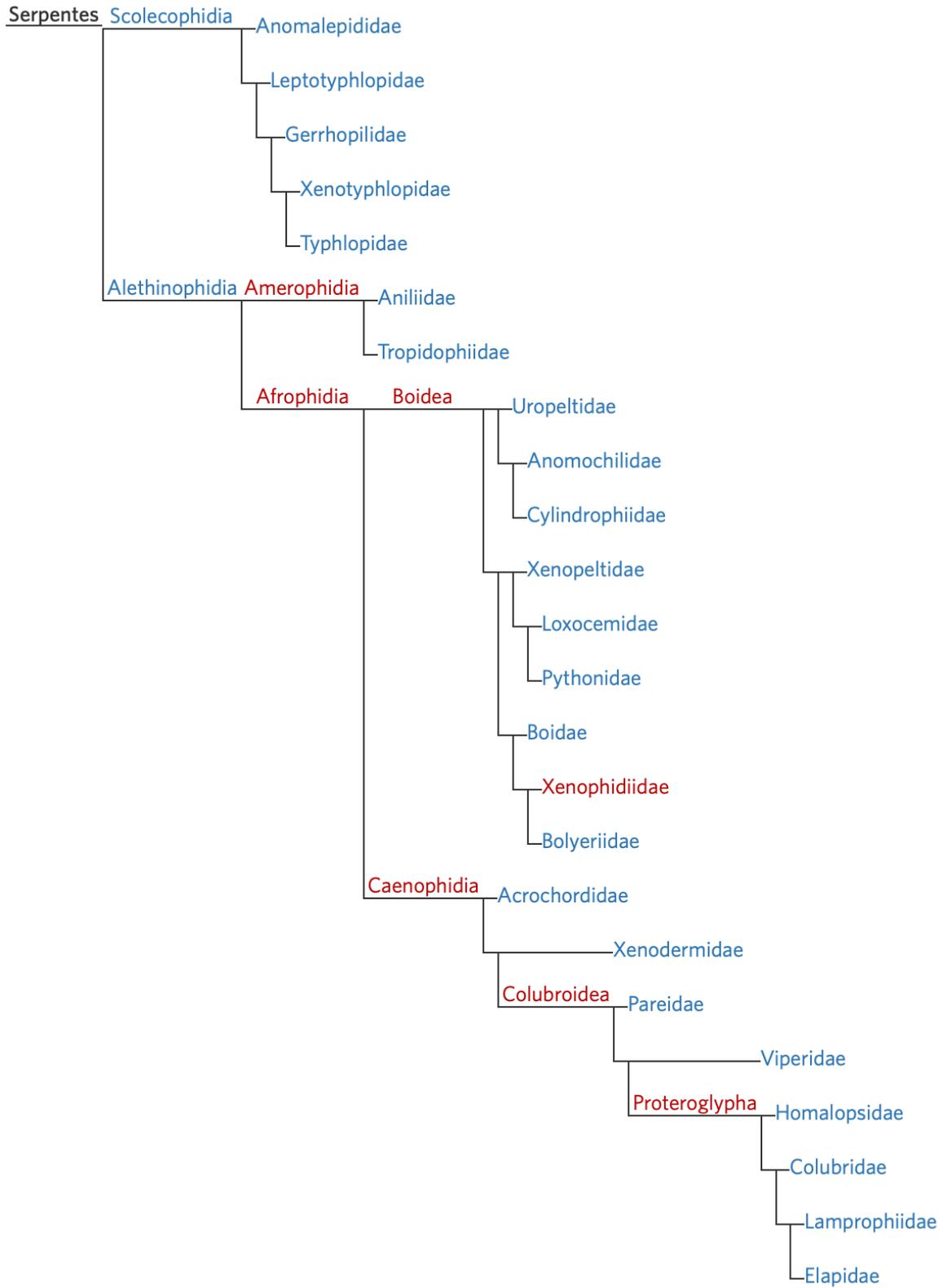


Figura 4. Filogenea del clado Serpentes y de los infraórdenes Scolecophidia y Alethinophidia (John J. Wiens, Carl R. Hutter, et.al., 2012).

La serpiente endémica de México, *Crotalus polystictus*, pertenece a la familia *Viperidae*, grupo de los crotálicos también conocidas como serpientes cascabel. Estos reptiles se caracterizan por la presencia del cascabel caudal en el extremo de su cola y, particularmente, la *C. polystictus* por sus lunares café a lo largo de todo su cuerpo, tal como se observa en la Figura 5.



Figura 5. Fotografía de una serpiente cascabel *C. polystictus* adulta (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018).

México es uno de los países más biodiversos del mundo, específicamente en la Meseta Central Mexicana y en las tierras altas circundantes. En estas regiones, se encuentra la mayor diversidad de serpientes cascabel del mundo (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018). Se estima que la mayor riqueza de especies *Crotalus* se encuentra en la mitad norte de México, en las regiones correspondientes a la sierra Madre Occidental y el noroeste del Altiplano Mexicano, así como, en la porción norte de la sierra Madre Oriental y en el extremo oeste de la Faja Volcánica Transmexicana (D.M. Paredes-García, A. Ramírez-Bautista y M.A. Martínez-Morales, 2011). Dicha distribución se logra apreciar en la Figura 6. No obstante, en la parte sureste del estado de Hidalgo, Tlaxcala, noreste de Puebla y centro de Veracruz se ha encontrado la presencia de las especies *C. atrox*, *C. intermedius*, *C. molossus*, *C. polystictus*, *C. ravus*, *C. scutulatus* y *C. triseriatus* (A.A. Valencia, 2006).

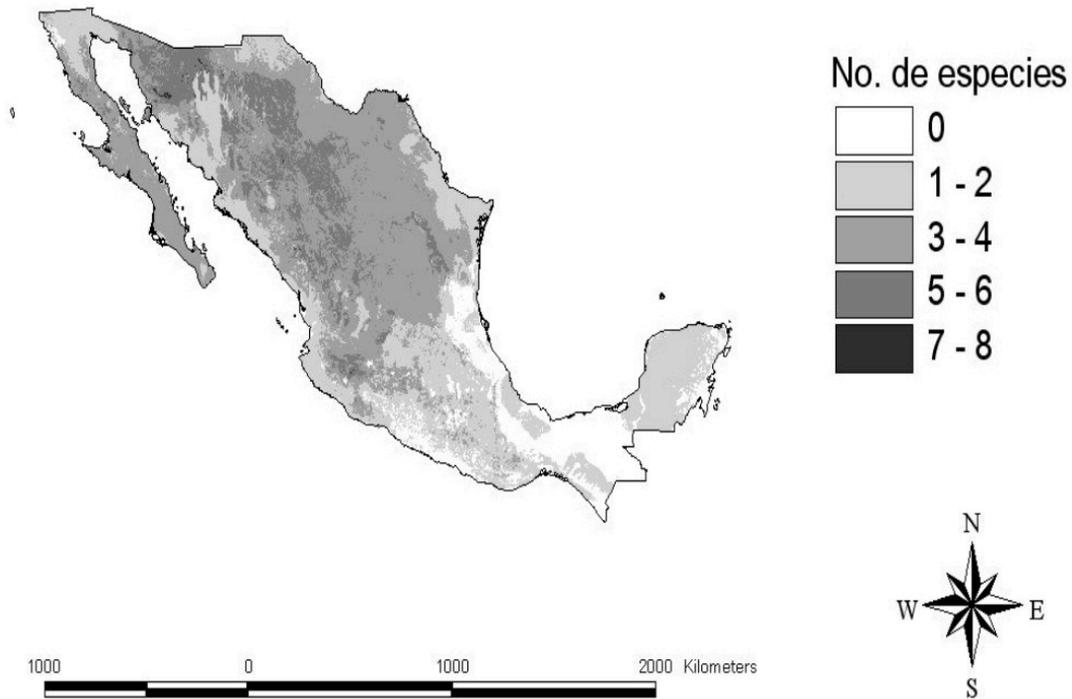


Figura 6. Patrón de distribución de la riqueza de especies del género *Crotalus* en México (D.M. Paredes-García, A. Ramírez-Bautista y M.A. Martínez-Morales, 2011).

Las *C. polystictus* son serpientes cascabel que miden aproximadamente entre 54-85 cm, las cuales poseen un rendimiento promedio de veneno de 101.3 mg / serpiente y son altamente peligrosas para los humanos debido al tamaño de sus colmillos y al alto rendimiento de su veneno (D.L. Hardy, 1982). Dentro de los síntomas más importantes de envenenamiento por *C. polystictus* se encuentra el entumecimiento de la cara, manos y pies, así como la aparición de ampollas locales y necrosis. Los efectos más graves para una persona que ha sido mordida por esta serpiente son de tipo hematológico, por ejemplo, trombocitopenia e hipofibrinogenemia con una elevación de la degradación de fibrina sérica. Dichos síntomas pueden disminuir tras la administración inmediata del Antídoto Crotalidae Polyvalent (ACP) (D.L. Hardy, 1982).

A pesar de que existe una gran variedad de serpientes cascabel en México, su veneno no ha sido tan estudiado, lo que podría llevar a nuevos descubrimientos. Lo que se conoce hasta ahora es que el veneno de las serpientes cascabel sí varía en cuanto a su composición

dependiendo de la especie de la cual se extraiga, de la edad de los reptiles, de la geografía, la temporada y el sexo, entre otros (Figura 7) (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018).

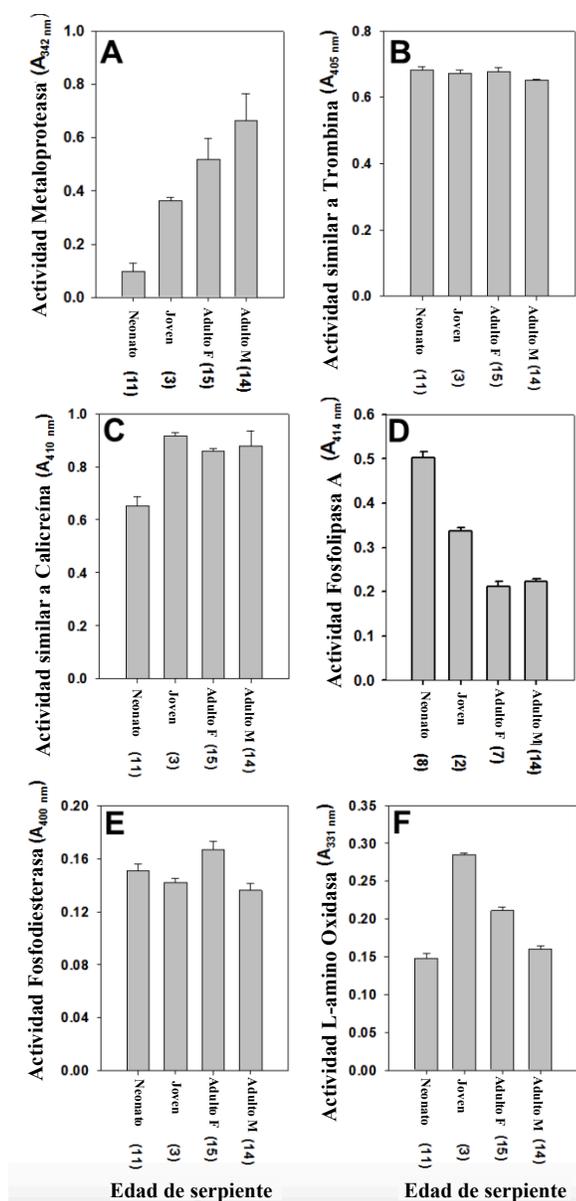


Figura 7. Actividades enzimáticas en los venenos de *Crotalus polystictus* en función de la clase de edad y el sexo; el tamaño de la muestra para cada uno se da entre paréntesis. Tenga en cuenta que la actividad de metaloproteinasas (SVMP) (A) es más baja y la actividad de PLA2 (D) es más alta en los venenos de recién nacidos; los venenos adultos muestran la tendencia opuesta. Los valores se muestran como promedios  $\pm$  DE. (A) Actividad metaloproteinasas; (B) Actividad similar a la trombina; (C) Actividad similar a la caliceína; (D) Actividad de fosfolipasa A2; (E) Actividad de fosfodiesterasa; (F) Actividad de L-aminoácido oxidasa. Modificado de: (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018).

Mediante una espectrometría de masas se logró identificar el proteoma del veneno de *C. polystictus*, mismo que permitió identificar 14 familias de proteínas, las cuales se muestran

en el Gráfico 2. Lo más importante a rescatar de este gráfico, es que, se puede observar que las desintegrinas no enzimáticas representan aproximadamente el 9% de todo el proteoma del veneno, siendo estas las de interés para este estudio (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018).

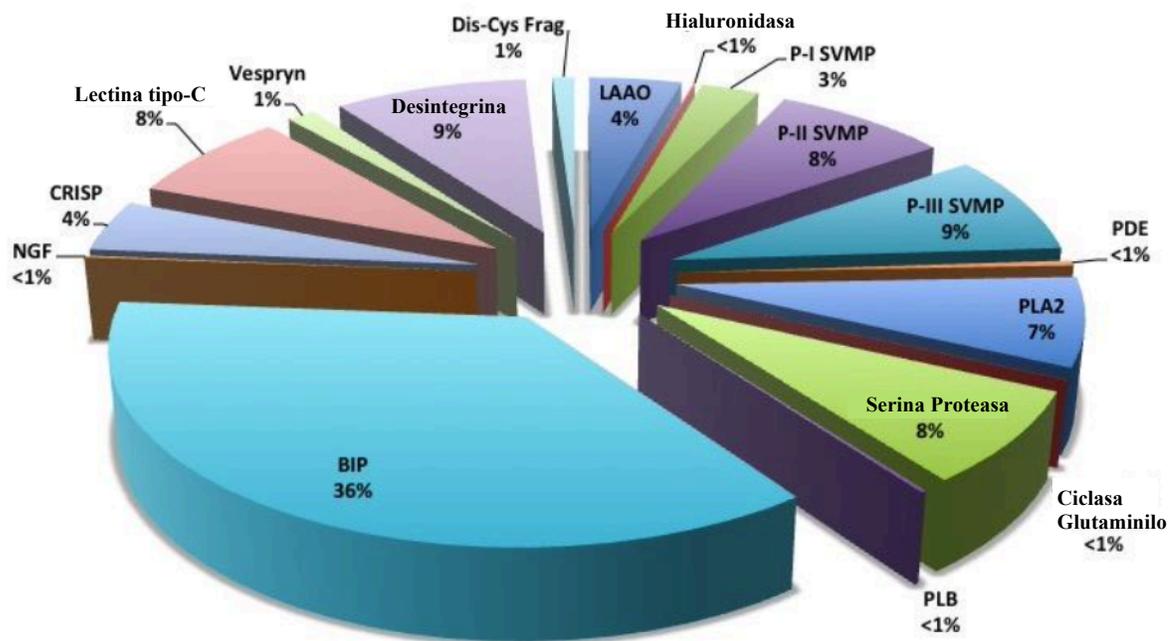


Gráfico 2. Proteoma de veneno de *C. polystictus* adulto. Abreviaturas: BIP, péptido inhibidor de bradicina; CRISP, proteína secretora rica en cisteína (helveprina); Dis-Cys Frag, fragmento de desintegrina que contiene cisteína; LAAO, L-aminoácido oxidasa; NGF, factor de crecimiento nervioso; PDE, fosfodiesterasa (exonucleasa); PLA2, fosfolipasa A2; PLB, fosfolipasa B; P-I SVMP, metaloproteínasa de veneno de serpiente de clase P-I; P-II SVMP, metaloproteínasa de veneno de serpiente de clase P-II; P-III SVMP, metaloproteínasa de veneno de serpiente de clase P-III. Modificado de: (Stephen P. Mackessy, *et.al.*, 2018).

### 5.3 Desintegrinas

Las desintegrinas son péptidos presentes en los venenos de serpientes que se conocen desde hace dos décadas y son características por tener un bajo peso molecular, es decir, entre 4 y 15 kDa. El término “*desintegrina*” se definió por primera vez en 1990 después del descubrimiento de la primera de estas en 1983 a partir del veneno de serpiente *Agkistrodon halys* “*Mamushi*” y, hace referencia a cualquier secuencia rica en cisteína y con una alineación homóloga a la que se encuentra en las proteínas del veneno de víbora (Mary Ann McLane, *et.al.*, 2004). La mayoría de las desintegrinas son sintetizadas con el dominio C-terminal de las metaloproteasas de la clase PII y son liberadas al veneno como resultado del procedimiento proteolítico. En cada desintegrina hay un motivo peptídico en el extremo C-

terminal que se cree que es responsable de las propiedades adhesivas de la proteína, compuesto de una secuencia formada por un patrón favorecido por un enlace disulfuro. Para la mayoría de las desintegrinas solubles, este motivo está conformado por tres aminoácidos, los cuales son arginina - glicina - ácido aspártico (RGD) (Mary Ann McLane, *et.al.*, 2004).

### **5.3.1 Estructura**

Las primeras desintegrinas que fueron caracterizadas estructuralmente por completo fueron la echistatina y la trigramina. Gracias a este descubrimiento, se estableció que tanto las desintegrinas solubles como las metaloproteasas son producto de la proteólisis de un mismo precursor. Además, estas proteínas están conformadas por cuatro dominios diferentes (A-D), siendo B el que contiene el sitio activo de la metaloproteinasa y C el que contiene la secuencia RGD inhibidora de la integrina (Mary Ann McLane, *et.al.*, 2004). Se ha considerado que el aspartato puede ser el responsable de la unión de las integrinas con su subunidad  $\beta$ , mientras que, el aminoácido N-terminal del dominio de unión a la integrina logra determinar la especificidad por medio de interacciones con la subunidad  $\alpha$  de la integrina (E.A. Rivas-Mercado, L. Garza-Ocañas, 2017).

Como para cualquier otra molécula, la conformación de la desintegrina es esencial para ejercer su actividad, esta muestra la secuencia RGD en la punta de un bucle de horquilla flexible. Es decir, además del dominio de unión, la actividad inhibidora de las desintegrinas también dependerá de la ubicación de las cisteínas y sus secuencias, ya que, estas son las responsables de formar los enlaces disulfuro en la molécula (E.A. Rivas-Mercado, L. Garza-Ocañas, 2017). Adicionalmente, se cree que la especificidad de una desintegrina reside en las cadenas extendidas de la horquilla. Estos péptidos están conformados por aminoácidos y enlaces disulfuro, los cuales son considerados primordiales para mantener la estructura funcional de la desintegrina (Mary Ann McLane, *et.al.*, 2004).

### **5.3.2 Clasificación**

Existen diferentes formas de clasificar a las desintegrinas, la primera es según su longitud y el número de enlaces disulfuro. Esta clasificación está dividida por dominios cortos, lo cuales

varían en longitud desde 41 a 52 aminoácidos y poseen 4 enlaces disulfuro; seguido de dominios medios, aproximadamente de 70 aminoácidos y seis enlaces disulfuro. El siguiente son dominios largos, con un estimado de 84 aminoácidos y siete puentes disulfuro y, finalmente, las desintegrinas diméricas y heterodiméricas. Especialmente las diméricas, cuentan con 64 subunidades de 67 aminoácidos con 10 cisteínas involucradas en la formación de cuatro puentes disulfuros intracadena y dos enlaces cisteína intercadena (E.A. Rivas-Mercado, L. Garza-Ocañas, 2017).

Otra clasificación importante es según la variabilidad en el dominio de unión a integrinas, en esta clasificación entran tres familias importantes: RGD, MLD y R / KTS16. En la Figura 8 se muestra un esquema de estos grupos y su especificidad de unión a integrinas. También, hay una clasificación en función de su acción inhibidora, la cual incluye a las desintegrinas RGD, responsables de bloquear a las integrinas  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Las MLD bloquean a las integrinas  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_9\beta_1$ , las desintegrinas de las familias VGD y MGD son las encargadas de bloquear a las integrinas  $\alpha_5\beta_1$  y KGD a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  con una alta selectividad. Finalmente, se ha reportado que WGD inhibe altamente a las integrinas dependientes de RGD tales como  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (E.A. Rivas-Mercado, L. Garza-Ocañas, 2017).

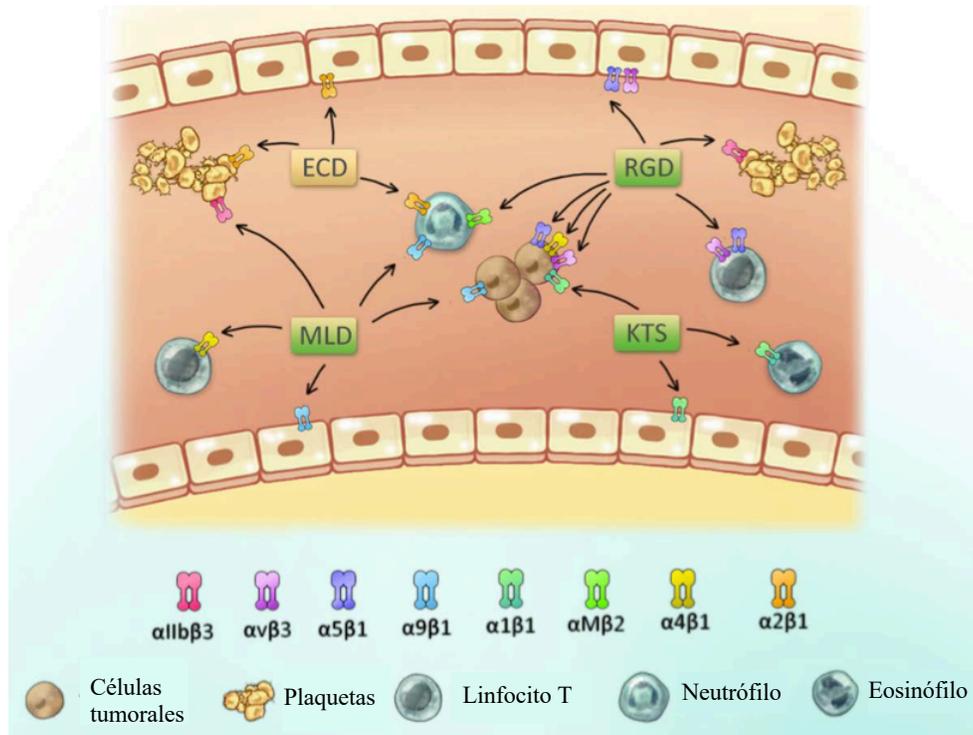


Figura 8. Esquema del sitio activo de las desintegrinas del veneno de serpiente y sus respectivos tipos de células de unión a la integrina. Se muestran algunas integrinas y tipos de células, con especial atención a las plaquetas, las células tumorales y los leucocitos. Los motivos de desintegrina se representan en verde y el motivo de desintegrina de clase PIII en beige. Modificado de: (V. David, et.al., 2018).

### 5.3.3 Actividad anticancerígena

Las desintegrinas han mostrado un alto potencial como agentes antitrombóticos tras varios estudios de la unión de plaquetas junto con estos péptidos. Uno de estos es la trigramina, la cual se aisló del veneno de *Trimeresurus gramineus* y fue descrita como un potente inhibidor de la agregación plaquetaria en humanos debido a su interacción específica con la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Esta interacción se debe a que la mayoría de las desintegrinas provenientes de venenos de serpientes que contienen la secuencia RGD o un motivo relacionado bloquean altamente la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (T.F. Huang, et.al., 1987).

La mayoría de las desintegrinas que bloquean y reconocen a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  también logran unirse a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Por ejemplo, la desintegrina contortrostatina fue caracterizada *in vitro* e *in vivo* en diferentes células tumorales y, se observó que reconoce a  $\alpha_v\beta_3$  mostrando su capacidad de inhibir la adhesión, migración, angiogénesis y progresión

tumoral (E. Lin, *et.al.*, 2010; M.R. Ritter, *et.al.*, 2009; Q. Zhou, *et.al.*, 2000). Además de la secuencia RGD en las desintegrinas, también podemos encontrar otras que poseen la secuencia KTS (Lys-Thr-Ser), misma que puede alterar la angiogénesis. Tal como es el caso de la desintegrina obtustatina, que inhibe el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en el tejido de la membrana corioalantoidea y el crecimiento tumoral en el carcinoma de pulmón tras unirse con alta afinidad a las integrinas  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  (C. Marcinkiewicz, *et.al.*, 2003; I. Staniszewska, *et.al.*, 2009; T. Momic, *et.al.*, 2014).

Las desintegrinas recombinantes muestran un atractivo potencial en la terapia contra el cáncer debido a la capacidad que tienen de inhibir la adhesión celular, paso crítico en la angiogénesis (V. David, *et.al.*, 2018). Ejemplos de éstas son las desintegrinas RGD recombinantes r-mojastina y r-viridistatina, la cuales han mostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, la capacidad de inhibir la adhesión de células endoteliales al fibronectivo, su migración, proliferación y formación en tubos, tras la fuerte unión a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  (S.E. Lucena, *et.al.*, 2013). Otro claro ejemplo de una desintegrina RGD recombinante que posiblemente pueda ser usada para el tratamiento del cáncer es la DisBa-01, al mostrar *in vivo* que puede bloquear la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Esta acción provoca la inhibición de la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en un modelo de Matrigel y, además, inhibe la metástasis pulmonar de células de melanoma *in vivo* (O.H.P. Ramos, *et.al.*, 2007). La leucurogina, una desintegrina ECD recombinante, ha mostrado que puede inhibir el crecimiento del tumor de Ehrlich en ratones en más del 50%, esto gracias a sus posibles efectos inhibitorios sobre la vascularización *in vivo*, actuando como un potente inhibidor de la angiogénesis (D.D. Higuchi, *et.al.*, 2011). Adicionalmente, se ha observado que la salmosina recombinante es capaz de inhibir la migración celular de melanoma de ratón B16B16 junto con la neovascularización *in vivo* (S.I. Kim, *et.al.*, 2003).

Uno de los descubrimientos más importantes sobre las desintegrinas recombinantes es la vicrostatina quimérica, que aumenta la actividad anticancerígena de los péptidos de echistatina y contortrostatina que forman la quimera. Estudios han comprobado que logra inhibir la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 o MDA-MB-435 *in vitro*, además de inhibir tubulogénesis y la migración de células endoteliales de la vena umbilical

humana (HUVEC) (R. Minea, *et.al.*, 2012). Asimismo, tras trabajar en el desarrollo de un método de administración clínicamente relevante para las desintegrinas, se generó una formulación liposomal de contortrostatina nativa que puede retrasar el crecimiento tumoral al reducir la densidad microvascular en un modelo animal de cáncer (S. Swenson, *et.al.*, 2004). También, gracias a la administración de los liposomas es posible administrar las desintegrinas de forma segura y eficaz por vía intravenosa y lograr que se acumulen pasivamente en la zona del tumor (S. Swenson, *et.al.*, 2004). Esto fue probado *in vivo* con liposomas que tenían empaquetado en su interior a la vicrostatina. Dichos resultados mostraron su gran capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, inducir la apoptosis de las células tumorales, y así, prolongar la supervivencia de los ratones (R. Minea, *et.al.*, 2012).

Una desventaja del uso de las desintegrinas como terapia contra el cáncer es que, su formulación es bastante difícil debido a que su bajo peso molecular genera una rápida depuración renal. Como solución a este inconveniente, se realizaron estudios donde se desarrolló una fusión de vincrostatina y un polipéptido similar a elastina de alto peso molecular (A192) para poder mejorar la retención de la desintegrina *in vitro* (S.M. Janib, *et.al.*, 2014). Afortunadamente, esta proteína de fusión (A192-VCN) mostró una depuración renal reducida y conservó la misma especificidad que la vincrostatina uniéndose a MD-MBA-435, MD-MBA-231 y HUVEC *in vitro* (S.M. Janib, *et.al.*, 2014). Este es sólo uno de los muchos descubrimientos que permiten abrir una nueva perspectiva para combatir el cáncer mediante el uso de desintegrinas recombinantes y sistemas de liberación.

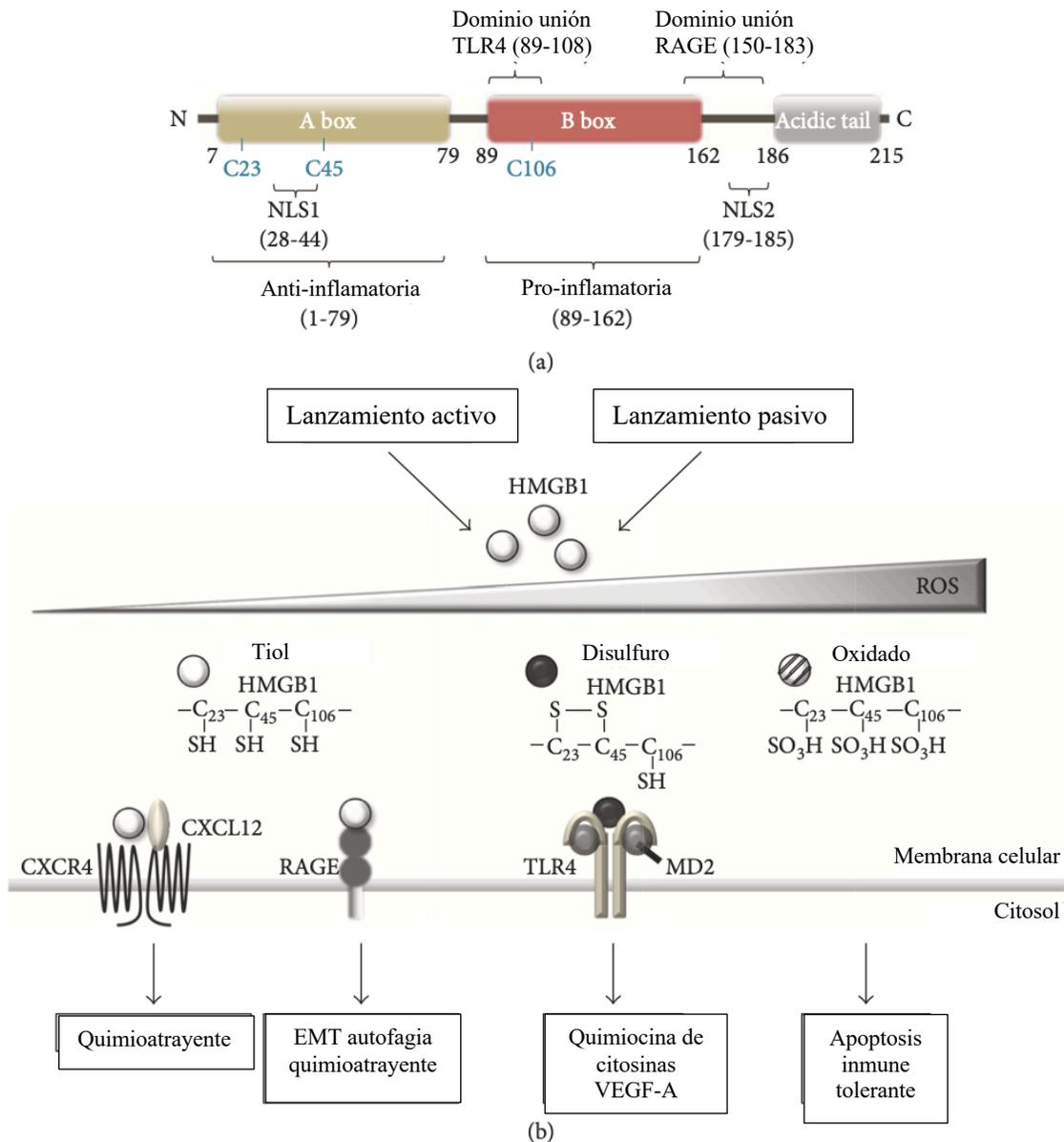


Figura 9. Estructura de HMGB1. (b) Los estados redox de HMGB1 regulan su actividad extracelular y de unión al receptor. Todo-tiol HMGB1 (at-HMGB1) completamente reducido tiene actividad quimioatrayente. at-HMGB1 forma un heterocomplejo con CXCL12 y se une a CXCR4, promoviendo el reclutamiento de células inflamatorias a los tejidos dañados. La unión de at-HMGB1 a RAGE respalda su actividad quimioatrayente mediante el aumento de la secreción de CXCL12. El disulfuro HMGB1 (ds-HMGB1) tiene actividad de citoquina única. ds-HMGB1 induce la liberación de citocinas proinflamatorias a través de la señalización mediada por TLR4. El HMGB1 totalmente oxidado no tiene actividad de citocina o quimiotaxis, por lo que induce tolerancia inmunitaria. Modificado de: (Su Yeon Lee, et al., 2018).

### 5.3.4 Integrinas y el cáncer

Como se mencionó anteriormente, las integrinas son una familia de proteínas transmembranales heterodiméricas formadas por un enlace no covalente entre las

subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (M. Barczyk, *et.al.*, 2010). Se ha demostrado que las integrinas participan activamente en diferentes procesos de señalización celular, por ejemplo, la transducción de señales intracelulares, la organización del citoesqueleto, la adhesión, crecimiento, supervivencia, desarrollo, diferenciación y apoptosis de una célula. Adicionalmente, se ha confirmado su participación en la reparación tisular, respuestas inmunes y el tráfico de leucocitos, así como en diversas enfermedades incluidas las autoinmunes, genéticas y el cáncer (Berman, A.E., *et.al.*, 2003). Tomando un enfoque específicamente sobre el cáncer, las integrinas regulan ciertas funciones biológicas en las células cancerígenas, así como la transmisión de señales moleculares del entorno celular como la forma, supervivencia, transcripción, proliferación y migración celular (Aplin, A. E., *et.al.*, 1999). Asimismo, se ha observado que comúnmente las integrinas  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_3\beta_1$  presentes en células epiteliales tienen niveles de expresión alterados en aquellas células cancerígenas de origen epitelial. Normalmente, en las células sanas estas integrinas favorecen la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal, sin embargo, en células cancerígenas pueden contribuir a la proliferación, migración, invasión y supervivencia de estas (Kren, A., *et.al.*, 2007). Es importante mencionar que, la expresión de la integrina varía entre tejido normal y tumoral, es decir, puede ser que alguna integrina se exprese altamente en un adenocarcinoma de mama, pero muy bajo en cáncer epitelial o viceversa.

La integrina  $\alpha_9\beta_1$  está muy involucrada en fomentar el crecimiento del carcinoma además de participar en la angiogénesis. En adición, se cree posible que induzca un fenotipo de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) en células de cáncer de pulmón (Gupta, S. K., *et.al.*, 2013; Avraamides, C. J., *et.al.*, 2008). El fenotipo EMT es un comportamiento temporal en que una célula epitelial adquiere las características y funciones de una célula mesenquimal como resultado a un estímulo interno o externo (Ferlay, J., *et.al.*, 2015). Los principales cambios que se pueden observar una vez adquirido este fenotipo es la pérdida de la polaridad celular, adquisición de una capacidad migratoria, resistencia a la apoptosis, capacidad invasora, entre otros (Vyas, V. K., *et.al.*, 2013). Lo más importante a considerar es que, dicho proceso afecta la respuesta a la farmacoterapia antitumoral generando cierta resistencia (Berman, A.E., *et.al.*, 2003; Story, M, *et.al.*, 1998).

Diferentes estudios han revelado la unión de la integrina  $\alpha_6\beta_4$  al canal de cloruro activado por calcio (CLCA), el cual es sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  expresado en células endoteliales pulmonares. Esto permite que las células cancerígenas se detengan en el lecho microvascular del pulmón y se promueva su crecimiento intravascular (Abdel-Ghany, M., *et.al.*, 2002). También, las integrinas  $\alpha_4\beta_7$  y  $\alpha_6\beta_4$  se expresan altamente dentro del nicho metastásico y, al unirse al regulador 2 del canal de cloruro activado por calcio humano (CLCA2) expresado en las células endoteliales pulmonares, contribuyen así a la metástasis del cáncer de mama hacia los pulmones (Abdel-Ghany, M., *et.al.*, 2001).

La angiogénesis hace referencia al desarrollo de capilares nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, el cual, dentro de sus pasos esenciales implica la degradación enzimática de la membrana basal, la migración de células endoteliales vasculares al espacio perivascular, la proliferación y alineación para formar nuevas estructuras tubulares y la formación de nuevos vasos sanguíneos (J. Bischoff, 1995). La angiogénesis es un proceso natural que ocurre en el organismo, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la reproducción femenina y la cicatrización de heridas. No obstante, una angiogénesis incontrolable e indeseable permite facilitar el crecimiento tumoral junto con la metástasis (J. Folkman, 1995). Como cualquier otro proceso de cuerpo humano, la angiogénesis debe de ser estimulada por diferentes factores, dentro de los cuales se encuentra el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). A su vez, se encuentran los factores inhibitorios endógenos, tales como, la trombospondina, inhibidor derivado del cartílago e inhibidor tisular de metaloproteasa *in vivo* (J. Folkman y Y. Shing, 1992).

Las interacciones entre las células vasculares y las matrices extracelulares también juegan un papel muy importante dentro de la angiogénesis. Dentro de las familias de moléculas de adhesión celular se encuentran las integrinas, los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, cadherinas y selectinas; todas han sido detectadas en los vasos sanguíneos angiogénicos (J. Bischoff, 1997). La integrina más estudiada en relación con la angiogénesis ha sido la  $\alpha_v\beta_3$  dado que se expresa altamente en los vasos angiogénicos a pesar

de que no se detecta fácilmente en vasos quiescentes (P.C. Brooks, *et.al.*, 1994). Esta misma integrina ha evidenciado la dependencia de la angiogénesis a las interacciones célula-matriz *in vivo* gracias a la observación de los antagonistas de anticuerpos y péptidos de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  al bloquear la angiogénesis en la membrana corioallateral de pollo (CAM) inducida por el factor bFGF y fragmentos del tumor (H.P. Hammes, *et.al.*, 1996; M. Friedlander, *et.al.*, 1995). Adicionalmente, al bloquear la integrina  $\alpha_v\beta_3$  se indujo apoptosis sólo en las células vasculares proliferativas y no en las células de los vasos preexistentes, siendo este proceso un mecanismo importante para la inhibición de la angiogénesis (P.C. Brooks, *et.al.*, 1994; S. Strömblad y D.A. Cheresh, 1996). Esta evidencia permite afirmar que la integrina  $\alpha_v\beta_3$  brinda señales de supervivencia a las células vasculares proliferativas durante la angiogénesis y la inducción de células vasculares (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

### ***5.3.5 Relación entre las desintegrinas de venenos de serpiente y el cáncer.***

Diversos estudios han surgido a partir de la investigación sobre la unión de las desintegrinas a las integrinas, lo cual, puede guiar hacia el descubrimiento de potenciales agentes terapéuticos. En la Tabla 3 se muestran las integrinas humanas con su respectivo ligando, además de su papel en el crecimiento y desarrollo tumoral, la metástasis y su interacción con las desintegrinas de veneno de serpientes conocidas hasta ahora (Arruda Macêdo, J. K., *et.al.*, 2015).

Tabla 3. Ligandos preferenciales, función sobre la formación y desarrollo de tumores e interacción de desintegrinas con integrinas humanas (Arruda Macêdo, J. K., et.al., 2015).

Integrin	Ligand [26]	Function	Disintegrin	
$\beta 1$	$\alpha 1$	Collagen IV, laminin	Tumor growth, migration, invasion, angiogenesis	Viperistatin [154]
				Obtustatin [154]
				Jerdostatin [100]
				Lebestatin [102]
	$\alpha 2$	Collagen I, laminin	Tumor growth, angiogenesis, migration, invasion and intravasation, proliferation in the target tissue	Alternagin-c [155]
				Rhodocetin [103]
	$\alpha 3$	Laminin, fibronectin, TSP	Migration, invasion and intravasation, extravasation (adhesion to blood wall), proliferation in the target tissue	lebein-1 [156]
				lebein-2 [156]
	$\alpha 4$	VCAM-1, VEGF-A, OPN, Tenascin-C, angiostatin, tTG, factor XIII	Angiogenesis, migration, survival in the circulation, extravasation (adhesion to blood wall), proliferation in the target tissue	R-mojastin 1 [113]
				EO5 [105]
				VLO5 [105]
				EC3 [105, 157]
				EMS11 [95]
				Bitisgabonin-2 [158]
				Eristostatin [108]
	$\alpha 5$	Fibronectin, fibrinogen	Tumor growth, angiogenesis, migration, invasion and intravasation, extravasation	EMS11 [95]
				EMF10 [115]
				EO4 [95]
				VLO4 [95]
				VA6 [95]
EC3 [105, 157]				
Cerastin [159]				
Lutosin [159]				
Crotatroxin [159]				
Durissin [159]				
Molossin [159]				
Viridin [159]				
Cereberin [159]				
Basilicin [159]				
Lachesin [159]				
Jararacin [159]				
Cotiarin [159]				
VB7 [95]				
Flavoridin [160, 161]				
Contortrostatin [125]				
Jarastatin [161]				

Integrin		Ligand [26]	Function	Disintegrin
				Saxatilin [136]
				Bitisgabonin-1 [158]
				Vicrostatin [162]
				Ocellatusin [163]
				Rhodostomin(Kistrin) [88, 164]
				Cumanastatin 1 [165]
				Leberagin-C [122]
	$\alpha 6$	Laminin	Tumor growth, angiogenesis, migration, invasion and intravasation, extravasation, proliferation in the target tissue	Lebein-1 [156] Lebein-2 [156]
	$\alpha 7$	Laminin	Migration, invasion and intravasation	Lebein-1 [156] Lebein-2 [156]
	$\alpha 8$	Fibronectin, vitronectin, tenascin-C, OPN, and nephronectin	Tumor growth, angiogenesis, migration, survival in the circulation	Flavostatin [166] Elegantin [166, 167]
	$\alpha 9$	VCAM-1, VEGF-A, OPN, Tenascin-C, angiostatin, tTG, factor XIII	Tumor growth, angiogenesis, migration, invasion and intravasation	bitisgabonin-2 [158] VLO5 [105]
$\alpha v$	Fibronectin, vitronectin, fibrinogen and osteopontin	Invasion and intravasation, migration	Saxatilin [136]	
$\beta 2$	$\alpha M$	Fibrinogen, ICAMs, iC3b, factor-Xa	Tumor growth, survival in the circulation	Jarastatin [161]
$\beta 3$	$\alpha v$	Fibronectin, vitronectin, fibrinogen, VWF, TSP, FGF-2	Tumor growth, angiogenesis, migration, invasion and intravasation, survival in the circulation, extravasation, proliferation in the target tissue	Accutin [168, 169]
				Accurhagin-C [170, 171]
				Contortrostatin [125]
				DisBa-01 [120]
				Echistatin [149]
				Insularin [172]
				Jarastatin [161]
				Leberagin-C [122]
				Rhodostomin (Kistrin) [88, 164]
				Cerastin [159]
				Lutosin [159]
				Crotatroxin [159]
				Durissin [159]
				Molossin [159]
				Viridin [159]
				Cereberin [159]
Basilicin [159]				
Lachesin [159]				

Integrin	Ligand [26]	Function	Disintegrin
			Jararacin [159] Cotiarin [159] Salmosin [117] Saxatilin [136] Flavoridin [160, 161] Triflavin [173] Trimestatin [174] Tergeminin [151] Eristicophin [151] Trigramin [88] Schistatin [175] Jerdonin [176] Vicrostatin [162]
$\alpha$ IIb	Collagens, fibronectin, vitronectin, fibrinogen, VWF, TSP	Survival in the circulation, extravasation, adhesion to blood wall	Rhodostomin (Kistrin) [88, 164] Eristostatin [108] EC3 [105, 157] Contortrostatin [125] Barbourin [151, 177] Saxatilin [136] Echistatin [149] Bitistatin [178] Cerastin [159] Lutosin [159] Crotatroxin [159] Durissin [159] Molossin [159] Viridin [159] Cereberin [159] Basilicin [159] Lachesin [159] Jararacin [159] Cotiarin [159] DisBa-01 [120] Jarastatin [161] Schistatin [175] Insularin [172] Tergeminin [151]

Integrin		Ligand [26]	Function	Disintegrin
				Eristicophin [151]
				Triflavin [173]
				Elegantin [166, 167]
				Dendroaspin [179]
				Cumanastatin 1 [165]
				Albolabrin [180]
$\beta 5$	$\alpha v$	Vitronectin	Cell survival, angiogenesis, migration, invasion	Rhodostomin (Kistrin) [88, 164]
				R-mojastin 1 [113]
				Microstatin [162]
				Bitistatin [178]
				Saxatilin [136]
				Contortrostatin [125]
$\beta 6$	$\alpha v$	Fibronectin, tenascin	Cell proliferation, Migration, invasion and intravasation	Leberagin-C [122]
$\beta 7$	$\alpha 4$	Fibronectin, VCAM, MAd-CAM	Proliferation in the target tissue	EC3 [105, 157]

Dentro de las desintegrinas más conocidas mencionadas anteriormente en la tabla, se encuentra la jerdostatina, la cual es una desintegrina recombinante obtenida del veneno de serpiente *Protobothrops jerdonii* que logra bloquear la adhesión de colágenos I y IV *in vitro* y la angiogénesis *in vivo* (Juárez, P., *et.al.*, 2010). La desintegrina lebestatina de la familia KTS interactúa con la integrina  $\alpha_1\beta_1$  logrando la inhibición de la adhesión y migración celular de células de ovario de hámster chino (células CHO) las cuales expresan a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  y PC12 (CHO-alfa1) a los colágenos de tipo I y IV, además de exhibir un efecto antiangiogénico *in vivo* (Olfa, K. Z., *et.al.*, 2005). Adicionalmente, la obtustatina, purificada del veneno de *Vipera lebetina obtusa*, es un potente inhibidor de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  y de la angiogénesis *in vivo* en la membrana corioalantoidea del pollo (Marcinkiewicz, C., *et.al.*, 2003).

La eristostatina, desintegrina aislada de *Eritocophis macmahoni*, se une a la integrina  $\alpha_4\beta_1$  para inhibir fuertemente la metástasis pulmonar y hepática en un modelo experimental en ratones a los cuales se les inyectó células de melanoma B16F1 y fueron tratados con eristostatina. Este tratamiento logró evitar la adhesión de células MV3 y CHOa4 al ligando  $\alpha_4\beta_1$  VCAM-1 (Danen, E. H., *et.al.*, 1998; Morris, V. L., *et.al.*, 1995). Por medio

de ensayos de unión directa se reveló que la eritostatina actúa haciendo que las células del melanoma sean un mejor objetivo para las células asesinas naturales humanas provocando lisis (Hailey, S., *et.al.*, 2013).

Específicamente de la familia de serpiente *Crotalus*, la r-mojastina 1 proviene de una clonación de glándulas venenosas de la serpiente cascabel *Crotalus scutulatus*. Se estima que posiblemente reconoce a las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_v\beta_5$  inhibiendo la adhesión plaquetaria a la fibronectina, la agregación plaquetaria inducida por ADP en sangre y la liberación de ATP plaquetario (Sánchez, E. E., *et.al.*, 2010). Se ha considerado un posible instrumento para el desarrollo de un agente antitumoral dados los resultados *in vitro* que se han obtenido, dentro de los cuales se encuentra la inhibición de la migración e invasión de células tumorales (Lucena, S., *et.al.*, 2013).

Otro miembro muy importante que se ha descubierto dentro de las desintegrinas es la accutina, un RGD compuesto por péptidos pequeños (5 241 Da) y es purificada a partir del veneno de serpiente *Agkistrodon acutus*. La principal función de esta desintegrina es la inhibición potente de la agregación plaquetaria humana al ser un antagonista de la unión del fibrinógeno a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . A partir de diversos estudios, los cuales serán mostrados a continuación, se ha evidenciado la inhibición de la adhesión de las células HUVEC a la matriz extracelular (ECM) y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, todo esto generado por la accutina (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

El primer estudio que se analizó fue el efecto de la accutina sobre la adhesión de HUVEC a ECM inmovilizados. En el Gráfico 3 se observa la capacidad de la accutina para inhibir de forma dependiente la adhesión de HUVEC al fibrinógeno, la fibronectina y la vitronectina. El porcentaje de eficiencia de adhesión de HUVEC al fibrinógeno inmovilizado (40  $\mu\text{g}$  / mL), fibronectina (30  $\mu\text{g}$  / mL) y vitronectina (10  $\mu\text{g}$  / mL) fue  $30.2 \pm 1.2\%$ ,  $49.2 \pm 2.2\%$  y  $24.0 \pm 0.7\%$ , respectivamente. No obstante, se encontró que la accutina muestra pocos efectos sobre otras matrices extracelulares incluidos el colágeno tipo I (80  $\mu\text{g}$  / mL) y la laminina (15  $\mu\text{g}$  / mL); datos no mostrados. Asimismo, no mostró un efecto inhibitorio significativo sobre la adhesión HUVEC-ECM ante los péptidos de control, GRGES (1 mmol / L) e Integrelin (50  $\mu\text{mol}$  / L; datos no mostrados). En cuanto a los efectos positivos que

mostró la accutina fue una inhibición en la adhesión de HUVEC a vitronectina inmovilizada (65% a 95%), a fibronectina (35% a 60%) y fibrinógeno (30% a 75%) (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

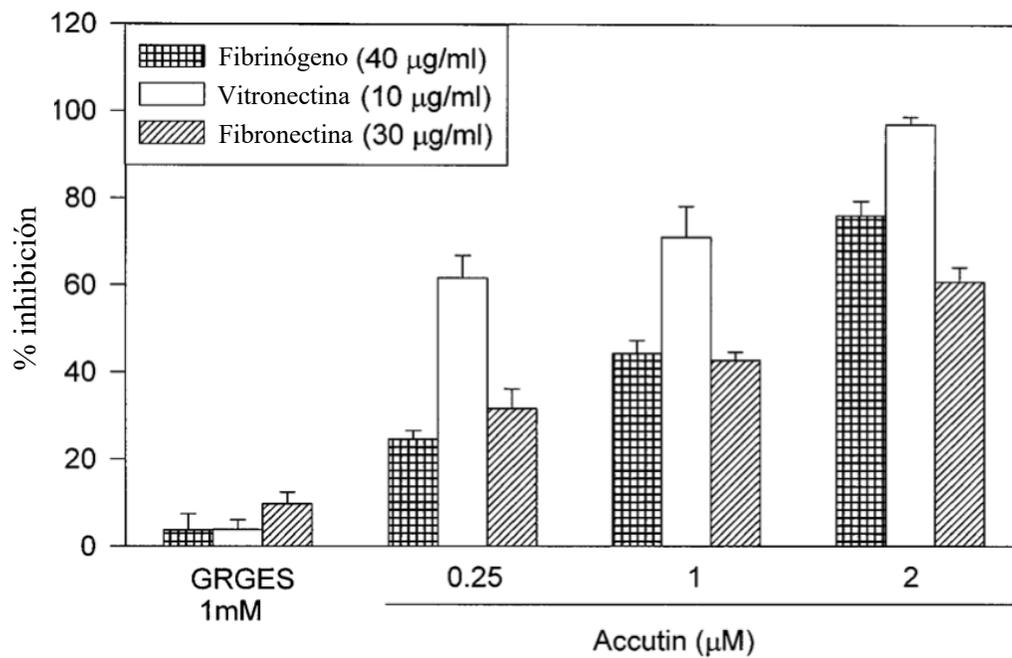


Gráfico 3. Efecto de accutina sobre la adhesión de HUVEC a ECM inmovilizados. Las HUVEC ( $5 \times 10^4$  células / pocillo) se sometieron a una placa de 96 pocillos, que se recubrieron previamente con fibrinógeno ( $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), vitronectina ( $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) o fibronectina ( $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), en la ausencia o presencia de concentraciones indicadas de accutina (0.25, 1, 2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) o GRGES (1  $\text{mmol} / \text{L}$ ). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la adhesión en comparación con las células de control en ausencia de accutina. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron al menos tres veces. Los datos se presentan como media  $\pm$ SEM ( $n = 3$  a 6). Modificado de: (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

En relación al efecto de la accutina sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, se realizaron diferentes modelos para estudiar el papel de las moléculas de adhesión sobre la angiogénesis (Stromblad S y Cheresch DA., 1996). El método más eficiente fue por medio del uso de Matrigel, el cual es una matriz de membrana basal que se extrae del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Dentro de sus componentes se puede encontrar la laminina, el colágeno tipo IV, nestina, sulfato de heparina, factor de crecimiento y metaloproteinasas de matriz, lo que permite simular la estructura, la composición, las propiedades físicas y funciones de la membrana basal celular *in vivo* (L. Lu-Lu, *et.al.*, 2019). Por esta razón, el Matrigel es una buena herramienta para poder medir la unión y diferenciación de muchas células dependientes de anclaje. En la Figura 10A se puede observar como las HUVEC

sembradas en el Matrigel se alinearon entre sí para formar estructuras tubulares semejantes a un plexo capilar en un total de 18 horas. En la Figura 10C y D se administró accutina a una concentración de 0.25 y 2  $\mu\text{mol}$  respectivamente y, se observa que logra inhibir la formación de la estructura tubular en el Matrigel de forma dependiente de la dosis. Por otro lado, en la Figura 10B se aprecia la acción de la integrelina (50  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), un antagonista de la integrina  $\alpha_{\text{fib}}\beta_3$  (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

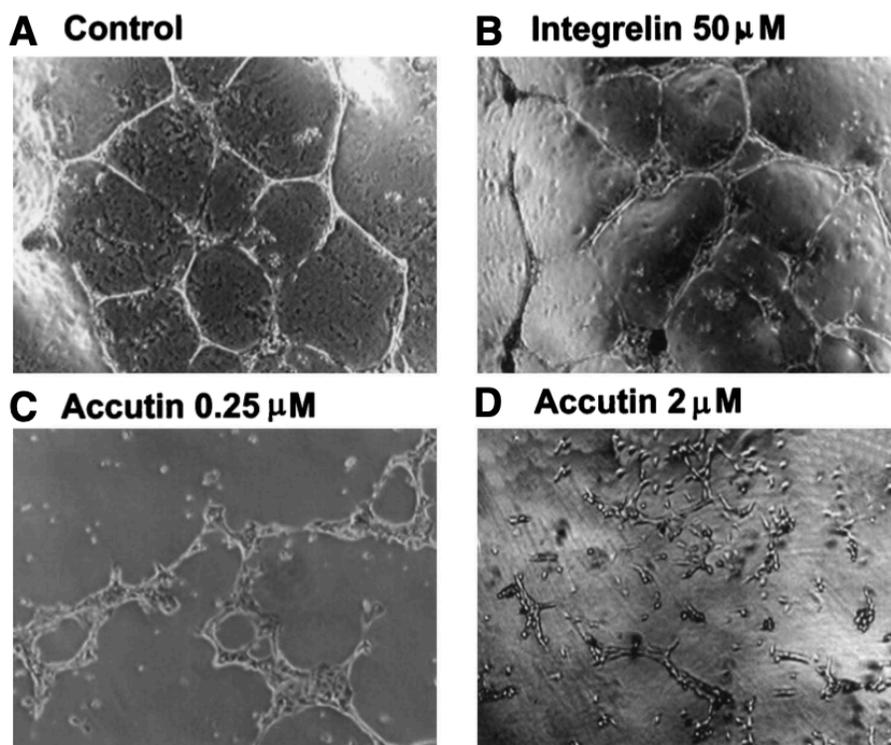


Figura 10. Efecto de accutina en la formación de tubos inducida por Matrigel de HUVEC *in vitro*. Las HUVEC ( $1 \times 10^5$  células / pocillo) se sembraron en Matrigel en presencia de vehículo (A, control), Integrelin (B, 50  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) o accutina (C y D, 0.25 y 2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , respectivamente) durante 18 horas. Después del lavado y la fijación, las células se fotografiaron bajo un microscopio de contraste de fase con un aumento de 40x (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

Adicionalmente, para evaluar el efecto de la accutina sobre la angiogénesis *in vivo* se realizó un estudio basado en el modelo *in vivo* del ensayo CAM de embrión de pollo (Figura 11). En la Figura 11A se observa la angiogénesis espontánea en la CAM tras el paso de 12 días desde la disección de la CAM de un embrión de pollo. Mientras que, en las Figura 11C-F se muestra como la accutina, tras la continua aplicación tópica por 48 horas, inhibió la angiogénesis espontánea igualmente de forma dependiente de la dosis. Finalmente, en la Figura 11B se

aprecia al péptido control GRGES (1 mmol / L), mostrando poco efecto sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

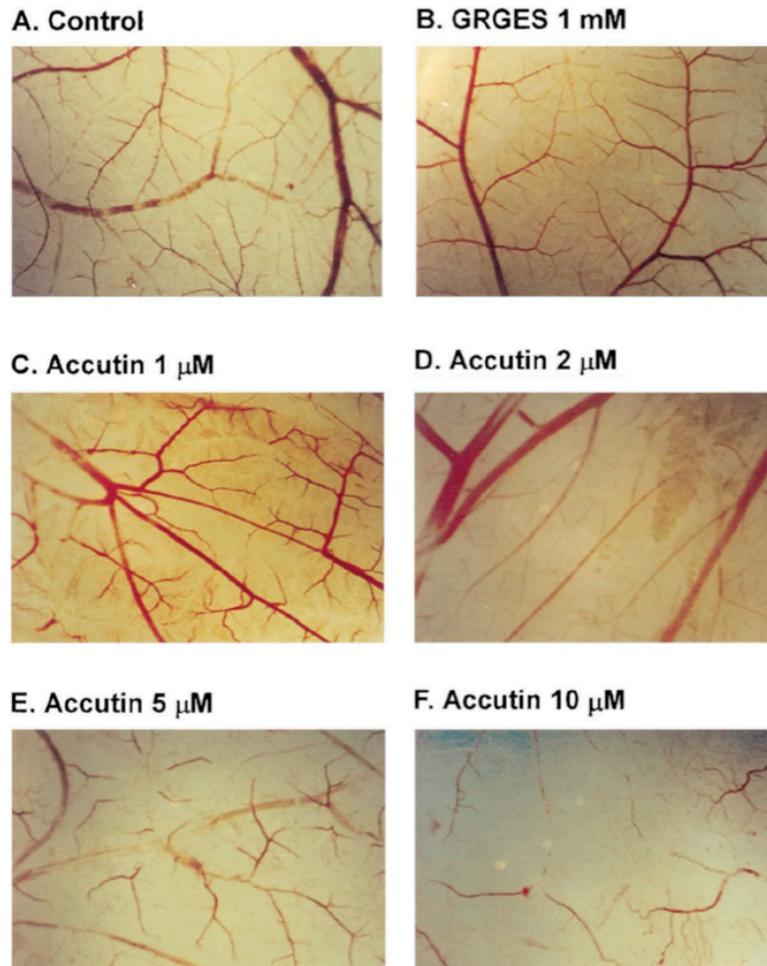


Figura 11. Efecto de acutina sobre la angiogénesis espontánea in vivo. Se incubaron CAM de embriones de pollo de 10 días con vehículo (A, control), GRGES (B, 1 mmol / L) o concentraciones indicadas de acutina (C a F, 1, 2, 5, 10 μmol / L, todo en 100 μL) durante 48 horas, y luego reseca, fijado y fotografiado con un microscopio estereoscópico a 10x de aumento (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

Otro ensayo de gran utilidad es la identificación de los receptores de unión de acutina en HUVEC identificando así a las integrinas expresadas que interactúan específicamente con acutina mediante citometría de flujo. Los resultados cuantitativos obtenidos se pueden apreciar en la Tabla 4, donde se observan las múltiples integrinas expresadas en HUVEC evidenciadas por la intensidad de fluorescencia media o el número medio de células teñidas positivamente. Una vez que las HUVEC fueron pretratadas con acutina (0.2 μmol / L), éstas emitieron una fluorescencia reducida y una disminución en el número de células teñidas positivamente ( $P < 0.001$ ) según sondas por 7E3 las cuales reconocen a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Por

otro lado, las HUVEC probadas con MoAb concentrado contra las integrinas  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  o  $\alpha_5$  no mostraron una reducción en la intensidad de fluorescencia emitida en respuesta al pretratamiento con accutina. En el Gráfico 4 se observa que la accutina además logró inhibir la unión específica de 7E3 a las HUVEC de forma dependiente de la dosis, mientras que GRGES (1 mmol / L) mostró un efecto reducido. Asimismo, en la Figura 12 se muestra la evidencia obtenida al incubar HUVEC con 7E3 (20  $\mu\text{g}$  / mL) o GRGDS (1 mmol / L), lo que generó la inhibición de la unión de accutina conjugada con FITC a HUVEC. También, se observó que la incubación de HUVEC con IgG no inmunológico (dilución 1:50) y GRGES (1 mmol / L) mostró poco efecto (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

Tabla 4. Efecto de Acutina (0.2  $\mu\text{mol}$  / L) sobre la unión de MoAbs anti-integrina a HUVEC. Se preincubó PBS o accutina (0.2  $\mu\text{mol}$  / L) con HUVEC, y se analizó la reacción de unión de varios MoAbs antiintegrina a HUVEC por separado. Todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:50. Las muestras de control contienen HUVEC en presencia de IgG no inmunes de ratón. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. El valor de p se determinó mediante la prueba t de Student pareada. Abreviatura: ND, no determinado. Modificado de: (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

Pretratamiento MoAb	Intensidad Fluorescencia			% células teñidas positivamente		
	PBS	Accutin 0.2 $\mu\text{mol}$ /L	Valor P	PBS	Accutin 0.2 $\mu\text{mol}$ /L	Valor P
Control IgG	19.11 $\pm$ 0.64 (n = 11)	15.3 $\pm$ 6.87 (n = 4)	.42	7.87 $\pm$ 0.69 (n = 11)	6.87 $\pm$ 1.30 (n = 4)	.48
Anti- $\alpha_2$ integrin	98.94 $\pm$ 7.75 (n = 7)	83.23 $\pm$ 12.96 (n = 3)	.31	88.42 $\pm$ 1.93 (n = 7)	77.57 $\pm$ 7.86 (n = 3)	.07
Anti- $\alpha_3$ integrin	34.66 $\pm$ 1.51 (n = 11)	36.08 $\pm$ 1.76 (n = 4)	.61	32.44 $\pm$ 2.21 (n = 11)	36.34 $\pm$ 5.16 (n = 4)	.16
Anti- $\alpha_4$ integrin	23.22 $\pm$ 3.24 (n = 4)	ND	—	9.26 $\pm$ 2.40 (n = 4)	ND	—
Anti- $\alpha_5$ integrin	72.90 $\pm$ 3.92 (n = 11)	87.16 $\pm$ 10.62 (n = 3)	.18	80.69 $\pm$ 3.92 (n = 11)	77.82 $\pm$ 6.17 (n = 3)	.68
7E3	68.97 $\pm$ 3.36 (n = 9)	34.5 $\pm$ 1.94 (n = 4)	<.001	93.84 $\pm$ 2.91 (n = 9)	21.84 $\pm$ 2.88 (n = 4)	<.001

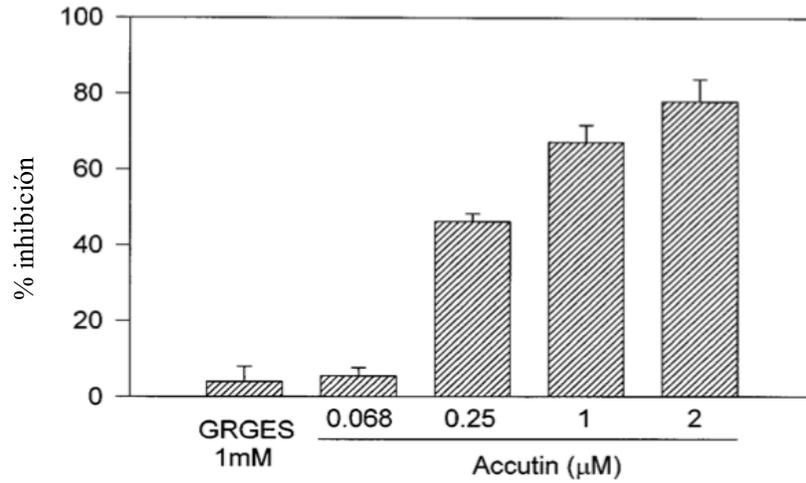


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de accutina sobre la unión de 7E3 a HUVEC. Las HUVEC se pretrataron con GRGES (1 mmol / L) o concentraciones indicadas de accutina (0.068, 0.25, 1.2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) y con el anticuerpo primario, 7E3 (20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). Después de la incubación con IgG-FITC (el segundo anticuerpo), se determinó la intensidad de fluorescencia media de las células mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la adhesión en comparación con las células de control (en ausencia de accutina). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Modificado de: (C. Hsin Yeh, et.al., 1998).

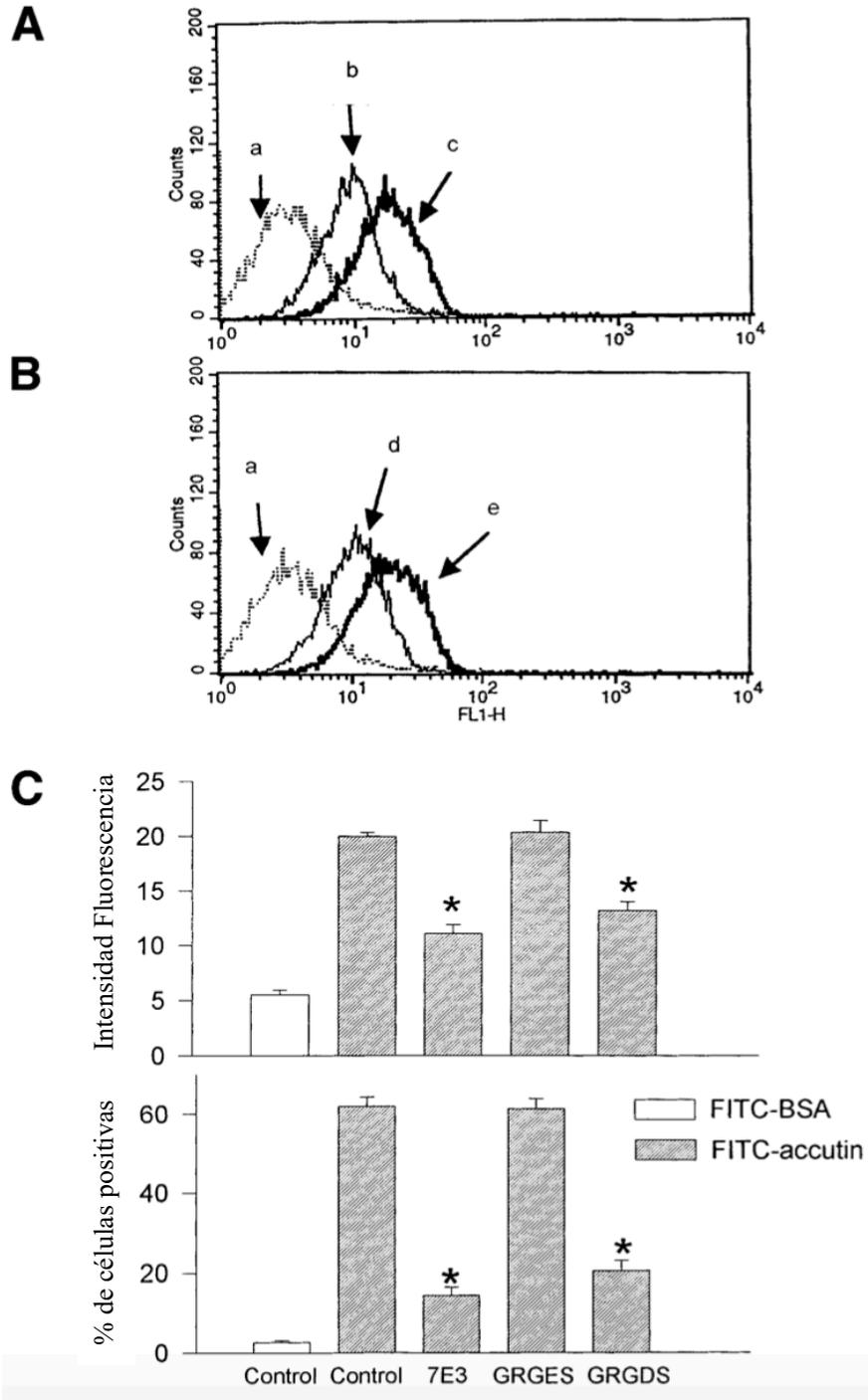


Figura 12. Efecto de 7E3 y GRGDS sobre la interacción de acutina conjugada con FITC con HUVEC. HUVEC pretratadas con (A) anticuerpos, es decir, 7E3 (b, 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), IgG no inmunes (c, dilución 1:50) o (B) péptidos (d, GRGDS, GRGES, ambos a 1  $\text{mmol} / \text{L}$ ) se incubaron con acutina conjugada con FITC (1.3  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión no específica se realizó incubando células con BSA conjugada con FITC (a en A y B). El rastreo de PBS (control HUVEC) y el de HUVEC pretratadas con GRGES fue casi idéntico. Se obtuvieron resultados similares en al menos cuatro experimentos separados. (C). Los análisis cuantitativos de FITC-acutinin y FITC-BSA se presentaron como la intensidad de fluorescencia media y el porcentaje de células teñidas positivamente. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM (n = 4). \*  $P < 0.05$  en comparación con el control. Modificado de: (C. Hsin Yeh, et al., 1998).

Finalmente, otro ensayo de gran utilidad es la caracterización de la apoptosis de HUVEC inducida por la accutina donde como primer paso se incubó las HUVEC con accutina ( $2 \mu\text{mol} / \text{L}$ ) por 18 horas. Tras el debido tiempo, las HUVEC desprendidas mostraron una morfología apoptótica, por ejemplo, contracción celular, formación de vesículas en la membrana plasmática y núcleos condensados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para analizar el sello bioquímico de la apoptosis, la fragmentación del ADN y la degradación del ADN internucleosómico; los resultados se exponen en la Figura 13. La evidencia mostró que el ADN aislado del vehículo o HUVEC pretratadas con GRGES ( $1 \text{ mmol} / \text{L}$ ) migró sobre el gel con una sola banda de alto peso molecular (carriles 1 y 2). Mientras que, el ADN que se aisló de HUVEC que fueron pretratadas con accutina se mostraron en el gel de forma degradada (carril 3) (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

Por otro lado, en el Gráfico 5 se muestra el análisis por citometría de flujo sobre la aparición de fragmentación del ADN mediante la medición del porcentaje de núcleos con contenido de ADN hipodiploide. Por su parte, en el Gráfico 5A se muestran las HUVEC normales (control), en el Gráfico 5B las HUVEC pretratadas con GRGES ( $1 \text{ mmol} / \text{L}$ ) que continuaron con su ciclo celular normal, el cual consta de un pico diploide mayor ( $G_0, G_1$ ), una región pequeña hiperdiploide (S) y un pico tetradiploide menor ( $G_2 / M$ ). No obstante, el pretratamiento con accutina ( $0.1$  a  $0.8 \mu\text{mol} / \text{L}$ ) logró aumentar el porcentaje de células hipodiploides de manera dependiente de la dosis (designadas como  $A_0$ , por ejemplo,  $34.15\%$ , en presencia de  $0.8 \text{ mmol} / \text{L}$  de accutina V  $4.8\%$ ,  $1 \text{ mmol} / \text{L}$  de GRGES). Este efecto se muestra en los Gráficos 5C-F y permiten afirmar que las células efectivamente habían sufrido una degradación de ADN la cual se asoció al proceso de apoptosis (C. Hsin Yeh, *et.al.*, 1998).

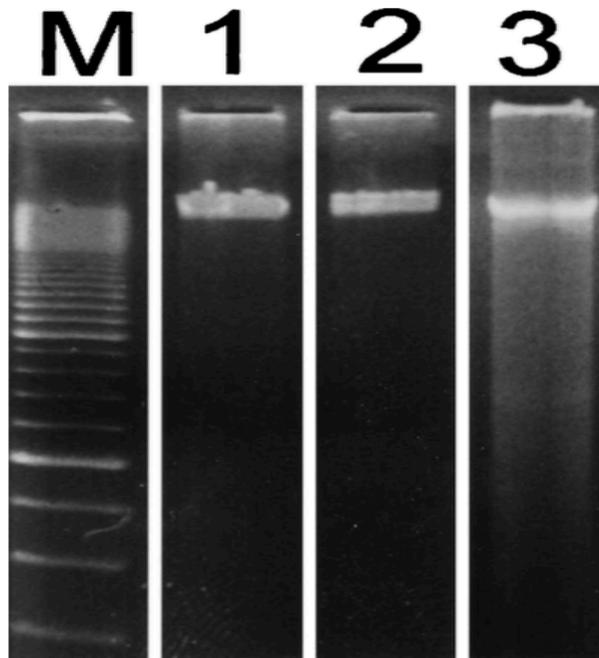


Figura 13. Patrones de fragmentación de ADN electroforético en HUVEC tratadas con accutina. Las HUVEC se incubaron con vehículo (carril 1), GRGES (1 mmol / L, carril 2) o accutina (2  $\mu$ mol / L, carril 3) durante 18 horas y se lisaron. El ADN celular total se aisló y se sometió a separación electroforética mediante un gel de agarosa al 1.8%. La fragmentación del ADN internucleosomal se representó como la banda oligonucleosomal de menor peso molecular. Se mostró una escalera de 100 pb en el carril M. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos separados (C. Hsin Yeh, et.al., 1998).

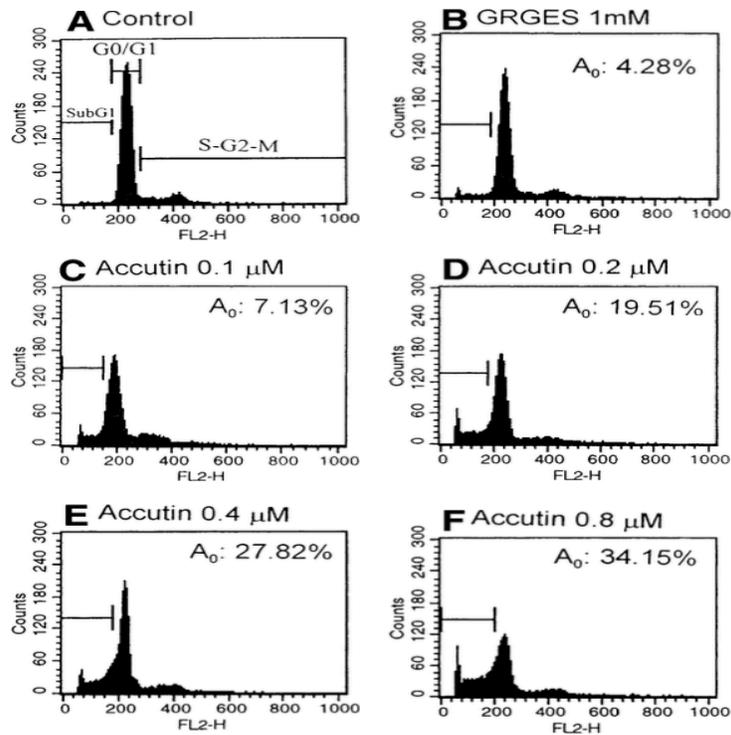


Gráfico 5. Histogramas del ciclo celular de citometría de flujo. Las HUVEC tratadas con GRGES (B, 1 mmol / L) o las concentraciones indicadas de accutina (C-F, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8  $\mu$ mol / L, respectivamente) durante 18 horas se

*permeabilizaron, fijaron y tiñeron con PI que contenía RNasa. y se analizaron las etapas del ciclo celular de las células. La región de subG1 representa las células que experimentan la degradación del ADN asociada a la apoptosis y se expresa como un porcentaje del evento ( $A_0$ ) con respecto al ciclo celular completo. El panel A muestra la etapa del ciclo celular de las HUVEC normales como control. Este es uno de los tres experimentos similares representativos (C. Hsin Yeh, et.al., 1998).*

## 5.4 Tipos de muerte celular: apoptosis y necrosis

### 5.4.1 Apoptosis, aspectos moleculares que la caracterizan y su relación con el cáncer

El término apoptosis se refiere a la muerte celular programada y ordenada, que tiene como objetivo eliminar células dañadas irreversiblemente o aquellas que son innecesarias, siempre de una forma perfectamente controlada, lo que minimiza el daño de las células vecinas. Este proceso juega un papel importante en la prevención del cáncer, el cual se explicará a detalle más adelante. Existe otro tipo de muerte celular conocida como necrosis, esta se refiere al daño celular masivo y descontrolado que se caracteriza por la liberación de enzimas lisosomales que dañan a las células vecinas provocando un proceso inflamatorio, ambos procesos son mostrados en la Figura 14. En este trabajo de investigación nos concentraremos únicamente en la apoptosis.

En la apoptosis las células desarrollan una secuencia de eventos morfológicos que culminan con la muerte (C. Ortega, et.al., 2001). Primero, debido al movimiento de fluidos fuera de la célula, se observa un encogimiento en ella a tal grado que pierde el contacto con las células vecinas; después, las cisternas del retículo endoplasmático liso comienzan a dilatarse hasta que logran fusionarse con la membrana plasmática; el resto de los organelos se mantienen intactos. Posterior a esto, la fosfatidilserina que normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana, se traslada hacia el exterior de ésta para que pueda ser reconocida por los macrófagos. El siguiente paso es que el núcleo comienza a sufrir cambios drásticos, por ejemplo, la cromatina comienza a condensarse y se acumula en la periferia, adicionalmente el nucléolo es desintegrado gracias a partículas osmiófilas. Después, con ayuda de las endonucleasas endógenas, el ADN comienza a romperse en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-220pb, cambio que se puede apreciar perfectamente si se realiza una electroforesis para ácidos nucleicos. Uno de los pasos finales es que la membrana

celular comienza a tener circunvoluciones y empieza a formar vesículas que engloban todo el contenido de la célula, adicionalmente, la célula pierde sus microvellosidades y las uniones célula-célula. Finalmente, las vesículas formadas se conocen como cuerpos apoptóticos, los cuales tienen su membrana y mitocondria intactas, estas son reconocidas por los macrófagos y son fagocitadas para eliminarlas del ambiente de forma limpia y ordenada (S. Perales Romero, s.f).

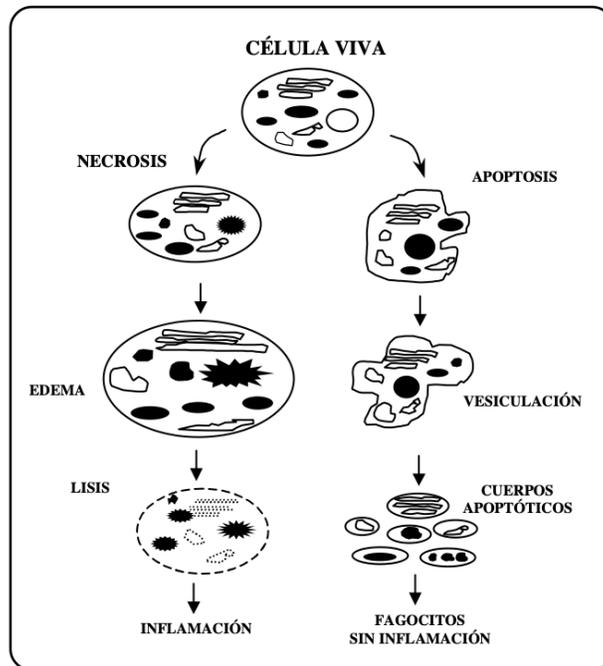


Figura 14. Secuencia de los eventos morfológicos que ocurren durante la muerte celular por necrosis y apoptosis (C. Ortega, et.al., 2001).

La gran mayoría de las células eucariotas muestran este mecanismo de defensa para erradicar aquellas células que representan una amenaza para la integridad del organismo y que pueden producir ciertas enfermedades como el cáncer, por lo que, la apoptosis forma parte del repertorio de respuestas celulares a señales externas o a cambios como el recambio celular y el desarrollo fetal. El proceso por el cual se lleva a cabo la apoptosis se ha dividido en tres diferentes fases, las cuales comprenden la fase inductora, la fase efectora y la fase de degradación (C. Ortega, et.al., 2001).

### 5.4.2 Fase inductora

Como primer paso, las células recibirán un estímulo de muerte el cual puede ser inducido por la ausencia de factores de crecimiento, por factores tróficos, glucocorticoides, radiaciones gamma y activación de receptores de la muerte (C. Ortega, *et.al.*, 2001). Existen diferentes vías de activación las cuales pueden depender del tipo celular, pero la respuesta siempre será la misma, la muerte celular programada. Una de las principales vías de activación en los mamíferos es por medio de los receptores de superficie celular que son activados por sus ligandos de muerte, estos receptores se encargan de transmitir la señal de apoptosis al interior de la célula. A continuación, en la Tabla 5 se muestran los receptores de la muerte y los ligandos más reconocidos y estudiados (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

Tabla 5. Receptores de la muerte y sus ligandos (C. Ortega, *et. al.*, 2001).

Receptor	Sinónimo	Ligando
Fas	Apo1 CD95	FasL
TNFR1	p55 CD120a	TNF Linfotoxina $\alpha$
DR3	Apo3 WSL-1 TRAMP LARD	Apo3L (TWEAK)
DR4 y DR5	Apo2 TRAIL-R2 TRICK-2 KILLER	Apo2L (TRAIL)

Los receptores de la muerte más conocidos son Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1), este último contiene un dominio extracelular que es rico en cisteína y una secuencia homóloga citoplasmática denominada dominio de la muerte. Particularmente, Fas se encuentra expresado en mayor cantidad en el timo, pulmón, corazón, ovario, riñón y linfocitos maduros y, cuando se une a su ligando FasL, participa en diversos procesos fisiológicos, por ejemplo, en la eliminación de células infectadas por virus o cancerosas mediante células T citotóxicas y NK. Por su parte, Fas es una molécula homotrimérica, es decir, cada trímero de FasL se unirá a tres moléculas de Fas, tal unión promoverá la

oligomerización del receptor y se reclutará a la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas o Mort 1). FADD se une al dominio de la muerte mediante su propio dominio efector de muerte a la procaspasa 8 que conducirá a su propia activación. La caspasa 8, también conocida como FLICE o MACH, se encargará de activar a las siguientes caspasas, por ejemplo, a la 9. Por otro lado, los receptores de TNF están presentes en todas las células de nuestro cuerpo, donde básicamente se encargará de activar la apoptosis cuando se generen cambios internos en alguna célula debido a una mutación o a una infección patógena que la guíe hacia una célula tumoral. El factor de necrosis tumoral (TNF) activa la apoptosis mediante dos diferentes mecanismos, el primer mecanismo es similar a la activación por Fas. Este comprende la unión de TNF a su receptor de muerte y, por lo tanto, la activación de la caspasa 8, que también activará a la cascada de caspasas hasta inducir apoptosis. El segundo mecanismo involucra al potencial de membrana mitocondrial, es decir, cuando éste presenta cambios abruptos se generarán radicales libres y ceramidas, vía hidrólisis de la esfingomielina, lo que provocará que se active una proteasa semejante a la caspasa 3 iniciando la cascada de activación (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

Para que el proceso de apoptosis pueda iniciar, es necesaria la presencia de ciertos genes y factores inductores. Como se mencionó anteriormente, las caspasas son elementos esenciales para activar un proceso apoptótico. Las caspasas pueden ser activadas por diferentes vías, la primera es la vía extrínseca del receptor de muerte, la cual necesita de la unión de los ligados a este. Entre los receptores de muerte más conocidos se encuentran el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y la proteína Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. La unión de ambas estructuras forma un complejo conocido como DISC (complejo de señalización que induce muerte), el cual inicia el ensamble y, por tanto, la activación de la procaspasa 8. Una vez que esta enzima se activa, se convierte en la caspasa 8 e inicia la apoptosis reclutando a otras caspasas ejecutoras (R. Sosa, N. Brandan, J. Jeréz, 2012).

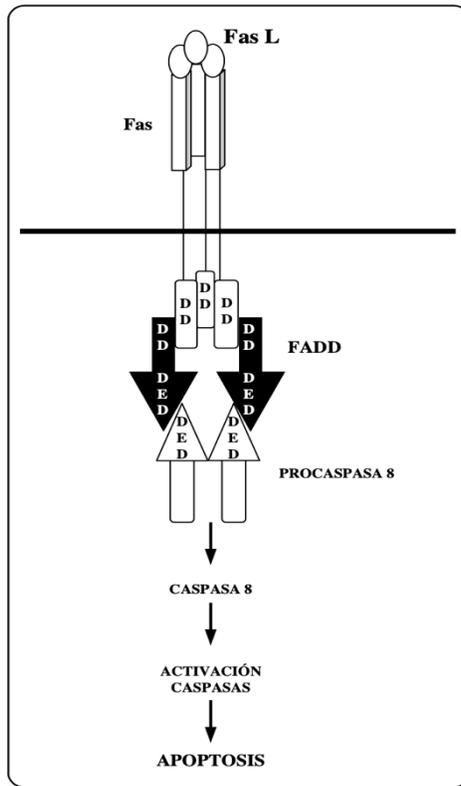


Figura 15. Mecanismo de señalización vía Fas/FaL. DD dominio de muerte; DED dominio efector de muerte; FADD dominio de muerte asociado a Fas (C. Ortega, et. al., 2001).

La segunda, la vía intrínseca mitocondrial, inicia dentro de la célula por medio de estímulos internos como el daño genético irreversible, estrés oxidativo, hipoxia, entre otros, siendo altamente regulada por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2. Cualquiera de estos estímulos provoca una permeabilidad mitocondrial aumentada permitiendo así que se liberen hacia el citoplasma diversas moléculas proapoptóticas como el citocromo C. Por último, la tercera vía es conocida como la vía del retículo endoplasmático intrínseco, es la menos conocida. Sin embargo, se cree que es dependiente de la caspasa 12 pero independiente de la mitocondria. Esta vía es activada cuando el retículo endoplasmático presenta situaciones de estrés oxidativo, hipoxia, radicales libres, etc. Provocando una síntesis reducida de la proteína adaptadora conocida como factor 2, asociado al receptor TNF (TRAF2), y se disocia de la procaspasa-2 resultando en la activación de la misma (R. Sosa, N. Brandan, J. Jeréz, 2012). El factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) es un regulador clave en la vía apoptótica mitocondrial y, junto con la procaspasa-9 y el citocromo C, forman el apoptosoma.

Apoptosoma se refiere al complejo de proteínas que se forma durante el proceso de apoptosis por vía intrínseca, y su principal componente es el Apaf-1 y en menor cantidad el citocromo C para activar la procaspasa-9 y dar lugar a la caspasa-9, tal y como se observa en la Figura 16. A pesar de que Apaf-1 puede activar el proceso de apoptosis, también lo puede inhibir evitando la activación de las caspasas al unirse a algún miembro de la familia Bcl-2 (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

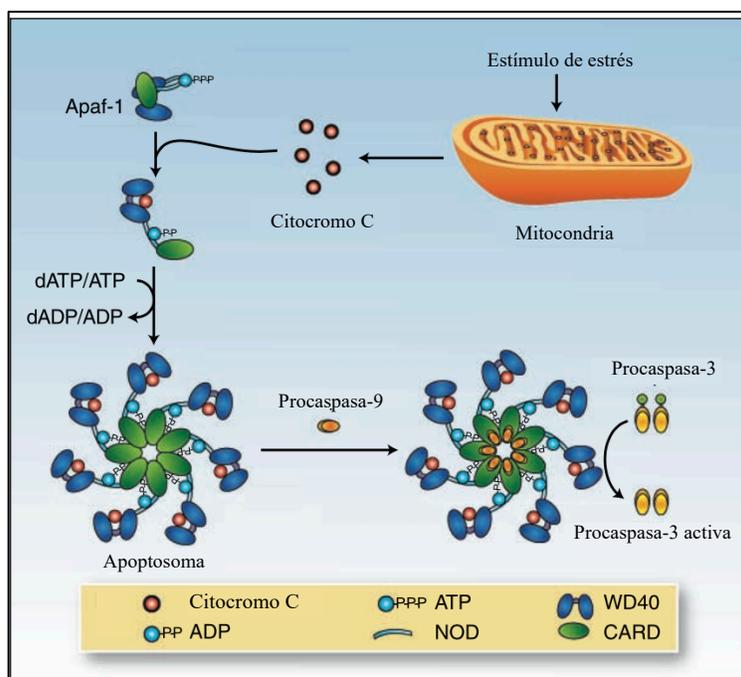


Figura 16. El citocromo C indujo la formación de apoptosomas y la activación de caspasas. En las células sanas, el citocromo C está secuestrado en el espacio intermembrana mitocondrial y Apaf-1 existe como un monómero inactivo en el citosol. En respuesta a estímulos de estrés (por ejemplo, daño al ADN o fármacos quimioterapéuticos) el citocromo C se libera de las mitocondrias al citosol donde se une a Apaf-1, lo que desencadena un cambio conformacional y la hidrólisis del dATP / ATP unido a Apaf-1. En un proceso que depende del intercambio de dATP / ATP por dADP / ADP, los heterodímeros Apaf-1-citocromo C se ensamblan en el apoptosoma, que proporciona una plataforma para la activación del iniciador caspasa-procaspasa-9. La caspasa-9 activada luego escinde y activa las caspasas de verdugo como la caspasa-3. Modificado de: (E. Ledgerwood e I. Morison, 2009).

Bcl-2 es un gen implicado en la regulación de la apoptosis, usualmente se mantiene metilado por microRNA (miRNA) y la sobreexpresión de esta proteína antiapoptótica confiere una “inmortalidad” a la célula tumoral. Este fue uno de los primeros genes que demostró que bloqueaba la muerte celular, lo que tenía relación con el desarrollo de leucemias granulocíticas de células B. La proteína Bcl-2 se encuentra de forma integral en la membrana mitocondrial con un peso aproximado de 26 kDa, además, también está presente en el retículo

endoplasmático liso y en la envoltura perinuclear. Bcl-2 está conformado por diferentes integrantes, sin embargo, una de sus características es que todos poseen uno de los cuatro residuos conservados homólogos de Bcl-2 (BHI a BH4). Por ejemplo, los que actúan como inhibidores de la apoptosis, Bcl-2 y Bcl-x1, poseen BHI y BH2. Por otro lado, los que son promotores de la apoptosis, es decir, Bax, Bak y Bok, contienen específicamente a los integrantes BH1, BH2 y BH3. La inhibición o activación de la apoptosis por los miembros de la familia Bcl-2 dependerá de diferentes estímulos como la ausencia de factores de crecimiento, la obstrucción de la salida del citocromo C desde la mitocondria o por el secuestro de Apaf-1 (C. Ortega, *et.al.*, 2001). Existen otros genes adicionales que están involucrados en la diferenciación y la proliferación celular, por tanto, también son indispensables para la apoptosis.

El primero de ellos es el proto-oncogen c-MYC proveniente de la familia de genes MYC. Se ha demostrado que este gen participa activamente en distintas vías metabólicas, por ejemplo, en la progresión del ciclo celular, el metabolismo celular, angiogénesis, adherencia celular, reparación del ADN, apoptosis y diferenciación celular. c-MYC se encuentra en la región cromosómica 8q24 y es un gen que se compone de tres exones, el primero tiene dos promotores, pero no codifica. De lo contrario, los exones dos y tres sí codifican para la proteína MYC, la cual es una fosfoproteína nuclear de 439 aminoácidos que juega un papel importante en la regulación de la expresión génica en células humana. En las células normales, c-MYC se encuentra regulado normalmente, no obstante, puede haber una pérdida en su regulación debido a diferentes mecanismos genéticos como la amplificación, alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas, mutaciones puntuales o inserción viral. Con respecto al ciclo celular, c-MYC promueve el paso de la célula en fase G<sub>0</sub> a fase G<sub>1</sub>, así como también induce la transcripción de genes, interviene en el crecimiento y la proliferación celular y es capaz de inducir apoptosis cuando se expresa aberrantemente durante toda la fase G<sub>1</sub>. Se le considera el “maestro de la activación”, ya que, se ha visto que tiene la capacidad de activar la gran mayoría de la maquinaria del ciclo celular, agregando que, este gen es clave durante la glucólisis y el inicio de la mitosis en células en reposo (M. Ospina Pérez y C. Muñetón Peña, 2011).

Por otra parte, el denominado “el guardián del genoma”, es decir, el gen p53, también es otro factor clave para la apoptosis. P53 es una proteína supresora de tumores que resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular. P53 es un gen que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y se encarga de detener el ciclo celular cuando la célula presenta un daño irreparable, así como activar ciertas enzimas de reparación de ADN, permite la entrada a la senescencia de la célula y activa la apoptosis. Más específicamente, p53 es encargado de activar una serie de genes transcritos, por ejemplo, el inhibidor del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>, p21, la proteína Gadd45 que interviene en la reparación del ADN y a Bax y Fas, ambos inductores de apoptosis. Cuando una célula está sobre expresando constantemente a p53, es posible que se deba a una lesión irreparable en el ADN o porque se activó tras una delección irreversible en la replicación, esto indicará que la célula debe sufrir apoptosis (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

#### 5.4.3 *Fase efectora*

La mitocondria es un organelo que se ha visto que juega un papel muy importante durante el proceso de apoptosis, ya que, muestra un sistema de apertura y cerrado de canales o poros para la liberación de ciertos factores proapoptóticos. Uno de los poros más reconocidos es el PT, el cual está conformado por proteínas de membrana interna como el traslocador de adenina nucleótido (ANT) y proteínas de la membrana externa como las porinas (canales aniónicos dependientes de voltaje o VDAC). Ambos al hacer contacto formarán un poro en la membrana por el cual pueden pasar moléculas de hasta  $\leq 1.5$  kDa, provocando un aumento en la osmolaridad de la matriz generando una desregulación de la mitocondria y la pérdida del potencial de membrana. Debido a estos cambios, la mitocondria se expandirá hasta el punto que explote y libere hacia el citosol todas las proteínas activadoras de caspasas que normalmente se encuentran en el espacio intramembranal. Asimismo, ciertas sustancias oxidantes y el aumento patológico de Ca<sup>2+</sup> pueden provocar una ruptura en la membrana externa de la mitocondria. Estudios previos sugieren que estos cambios mitocondriales son controlados por productos génicos de Bcl-2. Existen modelos con liposomas que llevan los canales VDAC en los que han demostrado que las proteínas Bax y Bak aceleran la apertura del poro para permitir que el citocromo C sea liberado, esto por medio de la formación de un megacanal como resultado de diversos cambios conformacionales en la membrana. Por otro

lado, se ha observado que las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL cierran los canales tras unirse directamente con Bax y Bak. Otro factor importante es que, durante la fase  $G_0 / G_1$ , Bcl-2 junto con c-MYC inhiben la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo, en el periodo de tiempo donde la célula es susceptible a apoptosis. Otras funciones que se le han atribuido a Bcl-2 es que junto con Abl inhiben la externalización de las fosfatidilserinas para que la célula no sea reconocida por los macrófagos. Además, se encarga de reclutar otras proteínas adicionales a la membrana mitocondrial, como por ejemplo, Apaf-1 y Raf-1, este último es un principal inductor del efecto supresor de Bcl-2 (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

Gran parte de los procesos involucrados en la apoptosis están acompañados del balance redox como resultado de la oxidación del glutatión, la oxidación de lípidos y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Gracias a este conocimiento, varios autores han identificado al estrés oxidativo como un contribuyente mediador de la apoptosis, lo cual ha sido comprobado por estudios realizados *in vitro*. El objetivo principal de dichos estudios fue demostrar que bajo ciertas condiciones de estrés oxidativo se puede inducir apoptosis en la célula; además, de demostrar que ciertos metales de transición como el  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  mediante la reacción de Fenton generan el radical hidroxilo, radical más reactivo conocido hasta ahora. En contraparte, también se comprobó que la adición de agentes antioxidantes, como son la vitamina E, el N-acetil cisteína y la glutatión peroxidasa, contribuyen a la inhibición de apoptosis (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

#### 5.4.4 *Fase de degradación*

Esta fase se caracteriza por la acción de diferentes enzimas catabólicas, como las endonucleasas y las caspasas, para iniciar diversas alteraciones ultraestructurales en la célula. Durante el proceso de apoptosis, en la mayoría de las células, el ADN sufre una fragmentación para formar segmentos iniciales de 300 kb, los cuales serán degradados en fragmentos de 10 a 50 kb hasta ser liberados como oligonucleótidos de 180-200pb, los cuales son muy característicos de la apoptosis. Cabe mencionar que, esto ocurre en la mayoría de las células que sufren apoptosis, sin embargo, siempre hay excepciones donde esto puede no suceder. Entre los principales sistemas enzimáticos que logran llevar a cabo este proceso están las DNAsas, las cuales generan fragmentos de ADN de  $\geq 50$  kb, así como la DNAsa I,

las ciclofilinas A, B, C, Nuc 18, nucleasa que requiere  $Mg^{2+}$  y la endonucleasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Mediante la realización de estudios adicionales se ha comprobado que los cambios morfológicos en la célula y la fragmentación de su ADN no dependen de la presencia de  $Ca^{2+}$ , sino de la presencia de  $Mg^{2+}$ . Como se mencionó anteriormente, las endonucleasas son elementos clave durante esta fase y por medio de estudios *in vitro*, se ha observado que pueden ser activadas por diferentes estímulos, como: concentraciones altas de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ , disminución del pH, proteasas como la tripsina, el factor mitocondrial inductor de apoptosis (AIF) y el factor de fragmentación del ADN (DFF). Una de las inconsistencias en este estudio fue que para regular la activación de las endonucleasas por el aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico se requiere una concentración mínima de 0.1-5 mM, niveles que jamás son alcanzados en condiciones fisiológicas. No obstante, en ciertos tipos celulares se ha observado que durante la apoptosis temprana se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico, contribuyendo a la activación de algunas enzimas latentes necesarias para lograr cambios estructurales característicos de la apoptosis. Algunas de estas enzimas bien identificadas son la transglutaminasa y la calpaína, la primera se encarga de unir las proteínas citosólicas mientras que la segunda puede degradar el citoesqueleto de la célula y producir cambios en la membrana. Gracias a estas atribuciones se ha llegado a pensar que las endonucleasas cumplen la función de limpiar el área después de que la célula ha muerto y no como tal durante el proceso de apoptosis (C. Ortega, *et.al.*, 2001).

Por su parte, las caspasas rompen cientos de polipéptidos intracelulares cuando son activadas. Estos polipéptidos incluyen elementos fundamentales del núcleo y de la membrana como son la b-actina, gelsolina y laminina A y B, que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura celular. También, están presentes la poli (ADP ribosa), polimerasa (P ARP), ADN-PK, ADN-topoisomerasa II, ARN polimerasa I y varias proteínas cinasas, las cuales están involucradas en el metabolismo celular y la reparación del ADN. Finalmente, proteínas involucradas en las diferentes vías de transducción de señales como las interleucinas IL-1b, IL-16 y IL-18 y proteínas como p21 / Cipl, p27 / kpl que ayudan a regular el ciclo celular. Cabe mencionar que, de acuerdo al estímulo y al tipo celular, algunas proteasas también son partícipes en la apoptosis, incluidas las serinas proteasas, calpaínas y proteosomas. Una particularidad de la apoptosis es la aparición de cambios en la superficie

celular para que los cuerpos apoptóticos puedan ser reconocidos y eliminados por los macrófagos. Uno de estos cambios es el traslado de la fosfatidilserina (PS) desde el interior de la membrana hacia el exterior. Algunos otros cambios observados son la pérdida de residuos de ácido siálico y la expresión de sitios de unión a la proteína trombospondina (TSP). Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia que demuestre que el ácido siálico pueda ser una señal de las células apoptóticas para su reconocimiento por macrófagos. Lo que sí es evidente es que, los macrófagos secretan trombospondina (TSP) para regular la ingestión de la célula apoptótica (C. Ortega, *et al.*, 2001).

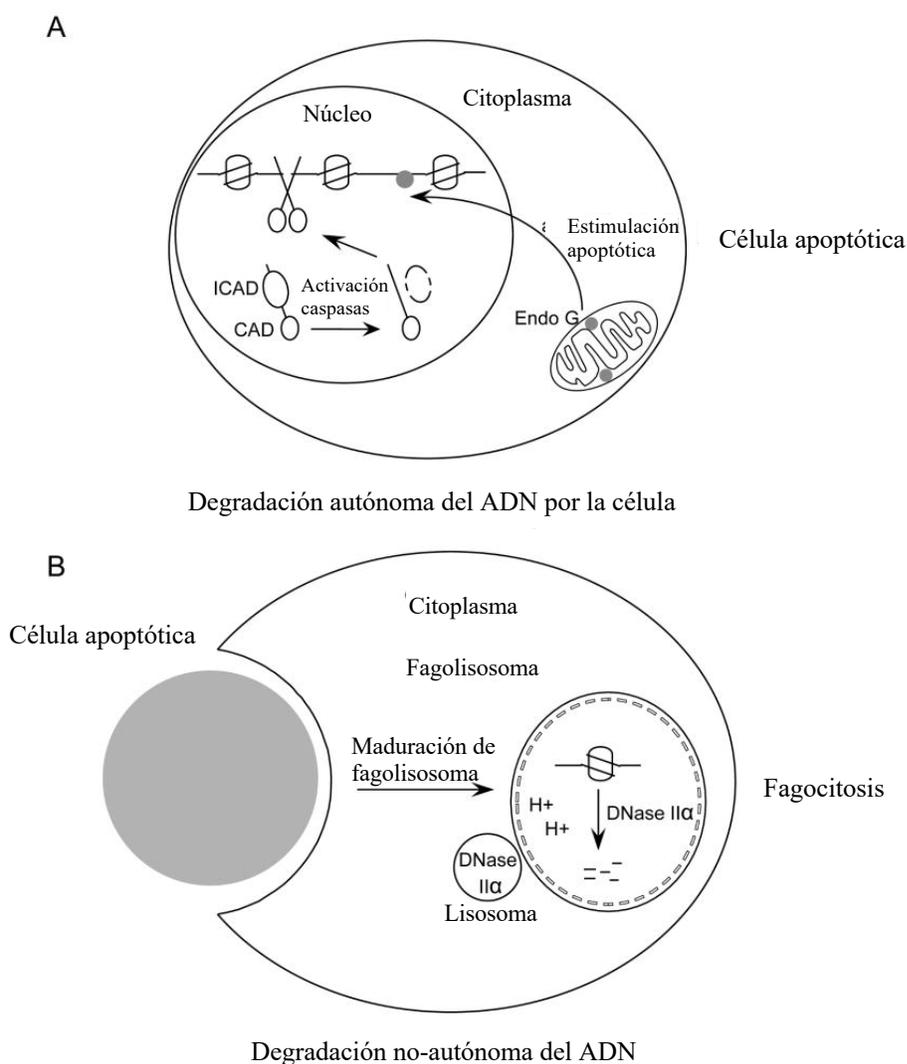


Figura 17. En las células vivas, la actividad de CAD es inhibida por ICAD y el Endo G es secuestrado en el espacio intermembrana mitocondrial. Durante la apoptosis, las caspasas activadas escinden ICAD y liberan CAD, que forma un homodímero y escinde el ADN enlazador entre los nucleosomas. La activación de las caspasas también desencadena la liberación de Endo G de las mitocondrias al núcleo para escindir el ADN cromosómico. B. Después de ser engullida por

*los fagocitos, la célula apoptótica reside en el fagosoma. A través de la maduración fagosómica, el fagosoma adquiere diferentes enzimas digestivas, incluida la DNAasa II  $\alpha$  de los lisosomas y su luz se acidifica gradualmente. En condiciones ácidas, la ADNasa II  $\alpha$  activa degrada aún más el ADN nucleosómico en nucleótidos. Modificado de: (He. B, et.al., 2009).*

La apoptosis temprana se puede identificar gracias a los cambios y a la pérdida final del potencial de membrana mitocondrial, que pueden detectarse con un marcador conocido como JC-1 que penetra selectivamente en las mitocondrias. En aquellas mitocondrias que tienen un funcionamiento normal JC-1 forma agregados que emiten un señal fluorescente a  $\sim 590$  nm. Sin embargo, cuando el potencial de membrana es reducido, el colorante formará monómeros y la emisión se desplaza a  $\sim 530$  nm, valor que es indispensable para medir la potencia del potencial de membrana cuando la célula entra en etapa de apoptosis temprana. Por otro lado, para detectar células durante la etapa de apoptosis intermedia es muy común utilizar la proteína anexina V, la cual tiene una alta afinidad a la fosfatidilserina (PS). Además de la anexina V, es necesario realizar una tinción de contraste con ciertos marcadores adicionales para diferenciar el proceso de la apoptosis temprana y la tardía, estos marcadores son yoduro de propidio o 7-AAD. Por último, para detectar células en estado de apoptosis tardía es muy común utilizar la técnica de *Apo-Direct assay*. Este es un método de doble tinción que utilizan FITC-dUTP para marcar las rupturas presentes en el ADN de la célula, es decir, detecta la multitud de terminaciones 3'-OH (Labclinics, 2015).

#### **5.4.5 Necrosis**

La necrosis es un tipo de muerte celular no programada, es decir, una muerte celular desordenada. Este proceso se presenta cuando factores externos de la célula logran superar las condiciones fisiológicas estables de un tejido, provocando que la célula presente un estrés excesivo e incontrolable. Algunos de los factores responsables de causar dicho estrés pueden ser los cambios drásticos de temperatura, sustancias químicas, hipoxia, estímulos mecánicos, radiación ionizante e irradiación ultravioleta (C. J. Carranza-Aguilar, *et.al.*, 2020). Algunas características morfológicas y fisiológicas que caracterizan a la necrosis son la inflamación celular, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, la degradación aleatoria del ADN y la liberación incontrolada de moléculas como HMGB1 y LDH al espacio extracelular, lo que causa la estimulación de una respuesta inmune (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018). La muerte celular por necrosis es un proceso pasivo que no requiere altas cantidades de energía y no

requiere una síntesis de *nov*o de proteínas. No obstante, está caracterizada por el aumento de la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, la disfunción mitocondrial, la proteólisis inducida por calpaínas y catepsinas y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (C. J. Carranza-Aguilar, *et.al.*, 2020).

Adicionalmente, la necrosis se caracteriza por la generación de fragmentos genómicos de tamaño irregular y manchas de ADN, mientras que, la apoptosis se caracteriza por la formación regular de fragmentos de ADN. Dichos fragmentos de ADN se pueden detectar mediante electroforesis en gel de agarosa de ADN y ensayos con la técnica molecular llamada *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL). Las endonucleasas apoptóticas no solo afectan al ADN celular al producir la clásica escalera de ADN, sino que también generan grupos 3'-OH libres en los extremos de estos fragmentos de ADN. Estos grupos se marcan en los extremos mediante tinción de apoptosis TUNEL, lo que permite la detección de células apoptóticas utilizando esta técnica histoquímica basada en biología molecular. Debido a que la necrosis se caracteriza por la liberación de moléculas como HMGB1 y LDH de las células moribundas al espacio extracelular y esto no ocurre en la apoptosis, la necrosis se confirma mediante el ensayo de liberación de HMGB1 o LDH (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018).

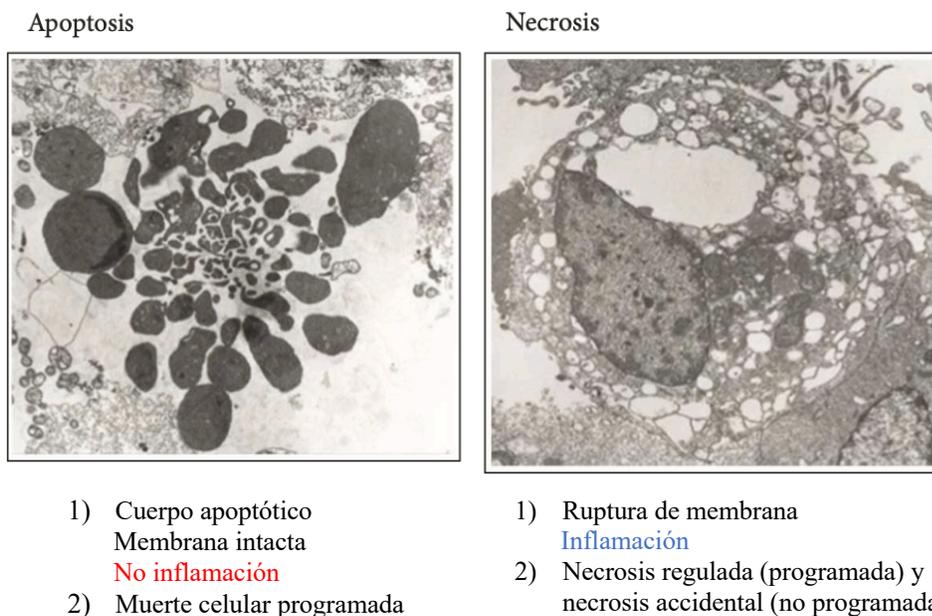


Figura 18. Diferencias que muestran los cuerpos celulares cuando presentan apoptosis y necrosis. Modificado de: (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018).

#### 5.4.6 Necrosis y su relación con el cáncer

Se conoce que el proceso de apoptosis guía a la supresión de tumores, por el contrario, se sabe que la necrosis tiene un potencial en la promoción de tumores como "una muerte celular reparadora". Se ha observado que la presencia de un núcleo necrótico en pacientes con cáncer está correlacionada con un aumento en el tamaño del tumor, la progresión tumoral y un mal pronóstico, debido a la aparición de quimiorresistencia y metástasis. Actualmente, se conocen dos causas principales por las cuales la necrosis influye directamente en la promoción de tumores. En primer lugar, está la liberación hacia el espacio extracelular de patrones moleculares asociados al peligro (DAMP), específicamente HMGB1, los cuales inducen la inflamación y la progresión del tumor. Adicionalmente, la inflamación crónica puede favorecer la progresión del cáncer a través de un modelo de cáncer que implementa los siguientes pasos: inflamación crónica, mutación de genes supresores de tumores, necrosis y mutación de protooncogenes (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018).

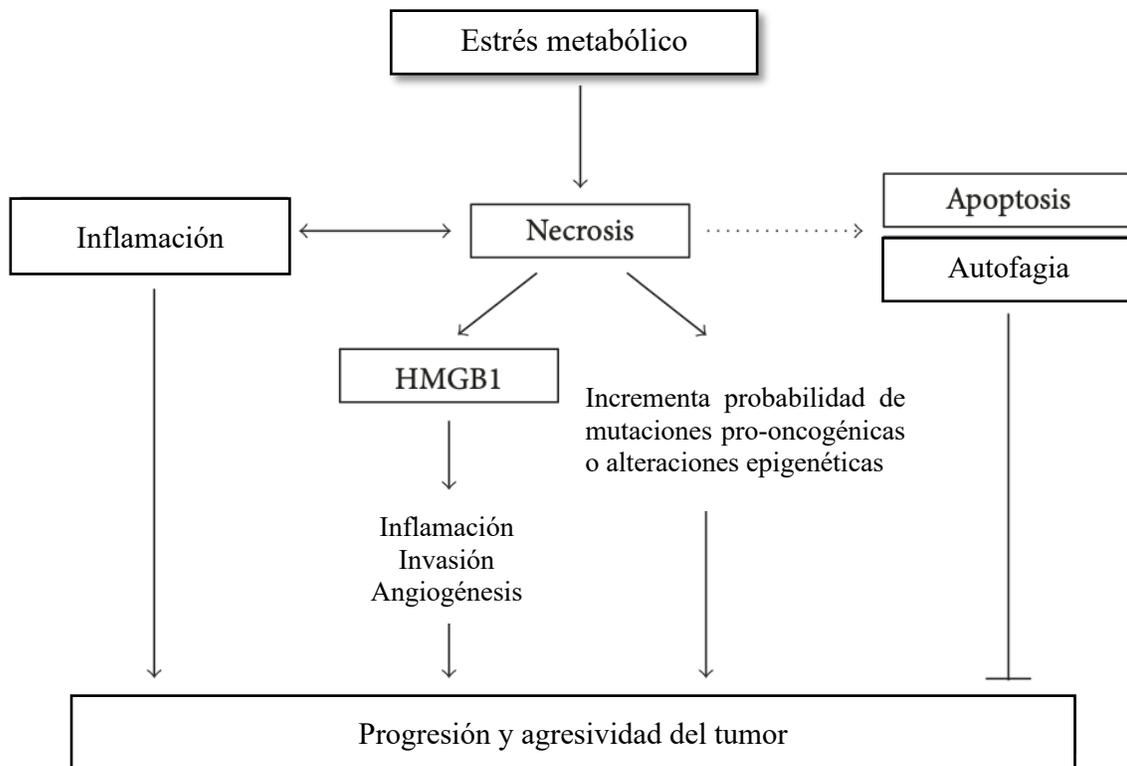


Figura 19. Diagrama que muestra cómo la necrosis promueve la progresión y agresividad tumoral al liberar la citocina proinflamatoria y angiogénica HMGB1, que puede contribuir a la malignidad al aumentar la probabilidad de mutaciones proto-oncogénicas o alteraciones epigenéticas. Modificado de: (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018).

Por su parte, HMGB1 es una proteína de 215 aminoácidos compuesta de dos dominios HMG-box (A y B) los cuales se unen con poca o ninguna especificidad de secuencia a formas no canónicas de ADN y una cola C-terminal ácida. Esta molécula puede unirse por medio de un núcleo al ADN sin especificidad de secuencia y permite que los factores de transcripción, como p53, p73, la proteína del retinoblastoma y el receptor de estrógenos, accedan a sus objetivos de ADN. Además, HMGB1 sano participa en la replicación, recombinación y reparación del ADN, manteniendo la dinámica de los nucleósidos y la estabilidad cromosómica. Sin embargo, cuando una célula está dañada, estresada, lesionada y sufre necrosis, esta proteína es liberada al exterior como moléculas DAMP. Las cuales, están asociadas con mediadores de señalización de respuestas inflamatorias en traumatismos y lesiones, funcionando como adyuvantes o como señales de peligro. Estas funciones logran mejorar la fagocitosis y la presentación de antígenos, activando el inflammasoma. En adición, los DAMP reclutan células inflamatorias inmune que ejercen una actividad promotora de tumores al inducir angiogénesis, proliferación de células cancerosas e invasividad (Su Yeon Lee, *et.al.*, 2018).

## **6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE APOPTOSIS.**

Existen diversos métodos de detección de apoptosis *in vitro* los cuales, según Elmore (2007), se pueden clasificar en 1) alteraciones citomorfológicas; 2) fragmentación de ADN; 3) detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores; 4) alteraciones de membrana; y 5) ensayos mitocondriales. La observación de las alteraciones morfológicas sigue siendo el parámetro más confiable para detectar el estado apoptótico de una célula, esto es gracias al microscopio electrónico de transmisión (TEM), considerado como el “*gold standard*” (Elmore, 2007). Dentro de las principales características esperadas a observar en una célula que está sufriendo apoptosis se encuentra un núcleo electrodenso, la desorganización de los organelos, una membrana celular intacta, la fragmentación nuclear, vacuolas alargadas y protuberancias irregulares. Además, mediante el uso del TEM se ha podido observar la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007).

Otra técnica muy eficaz para detectar una célula apoptótica es a través de la extracción y separación del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa en donde se buscan bandas de un tamaño aproximado de 180 a 200pb (Elmore, 2007). Algunas ventajas de esta metodología es su gran facilidad para realizarla, así como su rapidez y bajo costo. No obstante, solamente logra detectar los fragmentos de ADN cuando la célula ya se encuentra en estadios avanzados de apoptosis y se necesitan mínimo 1 millón de células para su detección (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007). Actualmente, se encuentran en el mercado diferentes tipos de técnicas para la detección de células apoptóticas *in vitro*, sin embargo, esta revisión bibliográfica estará enfocada en la técnica del ensayo de TUNEL, anexina V y la detección de las caspasas, mismas que se irán analizando a continuación.

## 6.1 Ensayo de TUNEL

La técnica denominada *Terminal deoxynucleotidyl transferase Nick-End Labeling* (TUNEL) es otro método para detectar la fragmentación del ADN durante el proceso de apoptosis. Dicha técnica fue descubierta en 1992 por Gorczyca *et al.* (1992) y Gavrieli *et al.* (1992) de forma independiente. El principio de la técnica de TUNEL está basado en el uso de una endonucleasa, específicamente la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), misma que se encarga de catalizar la unión de un análogo de desoxinucleótidos (dNTP) en el extremo -OH terminal de la hebra de ADN fragmentada. Con el uso de diferentes marcadores se marcan a los dNTP, ya sea para poder ser identificados en las cadenas de ADN una vez que éste se fragmente o bien, para poder interactuar con uno o más marcadores detectables (Z. Darzynkiewicz, *et.al.*, 2008).

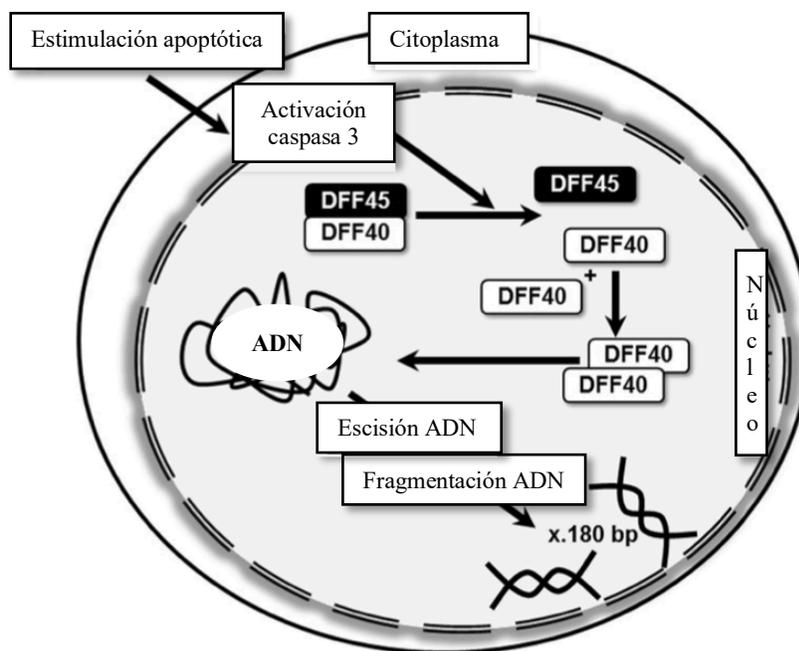


Figura 20. Mecanismo de fragmentación del ADN durante la apoptosis. La subunidad catalítica del factor de fragmentación del ADN (DFF40) forma un complejo con el inhibidor de DFF40 (DFF45). Durante la apoptosis, el complejo DFF40-DFF45 es escindido por la caspasa-3 activada, que se forma por escisión de la procaspasa-3 a través de los estímulos apoptóticos. DFF40 dimeriza y escinde el ADN en enlaces internucleosomales en fragmentos de 180pb y múltiplos de estos. Modificado de: (P. Majtnerová y T. Roušar, 2018).

### 6.1.1 Técnica del ensayo de TUNEL

De manera general, el primer paso necesario para poder aplicar esta técnica es realizar el cultivo celular y la recolección de células, seguido de la fijación y permeabilización celular para así permitir la penetración adecuada al núcleo de los reactivos que se utilizan en la reacción de TUNEL. Una vez realizados estos pasos, se lleva a cabo la unión de los dNTP marcados a los respectivos -OH terminales del ADN fragmentado utilizando TdT y, finalmente, la visualización de los reactivos marcados. Lo más común en el laboratorio es utilizar marcadores fluorescentes, no obstante, también se puede hacer una visualización de tipo enzimática (P. Majtnerová y T. Roušar, 2018).

Tal como en cualquier otro cultivo celular, las células deben de ser cultivadas bajo condiciones específicas y definidas con sustancias químicas de interés que les permitan mantenerse bajo las condiciones esperadas. Una vez que el cultivo se realiza correctamente, para la fijación de las células se utiliza formaldehído al 4%, principalmente para evitar que

se pierdan los fragmentos de ADN durante los lavados necesarios para completar el ensayo (CY Chang, *et.al.*, 2018; KR. Chohan, 2013; Y. Wang, *et.al.*, 2018; W. Ye, *et.al.*, 2017). El siguiente paso por seguir es la permeabilización, para la cual, las células son tratadas con etanol al 70% para permitir que la TdT acceda a los núcleos celulares. Una vez ocurrido este proceso, se requieren diversas soluciones, las cuales, además de los dNTP, pueden contener cacodilato de sodio o potasio, cloruro de cobalto y albúmina de suero bovino. Esta penetración ocasiona el buen funcionamiento de la TdT, permitiendo catalizar la unión de los dNTP marcados a los -OH terminales de la cadena de ADN fragmentada. (Y. Gavrieli, *et.al.*, 1992; W. GORCZYCA, *et.al.*, 1992; Li X y Z. Darzynkiewicz, 1995; Z. Darzynkiewicz, *et.al.*, 2008; B. Grasl-Kraupp, *et.al.*, 1995).

Ahora bien, para el marcaje de dNTP se puede utilizar un marcaje directo, el cual, tal como lo dice su nombre se puede detectar directamente. Pero, también existe la estrategia de marcaje con bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de timidina, quien necesita utilizar un sistema de anticuerpos para ser detectado, tal como se muestra en la Figura 21. (P. Majtnerová y T. Roušar, 2018).

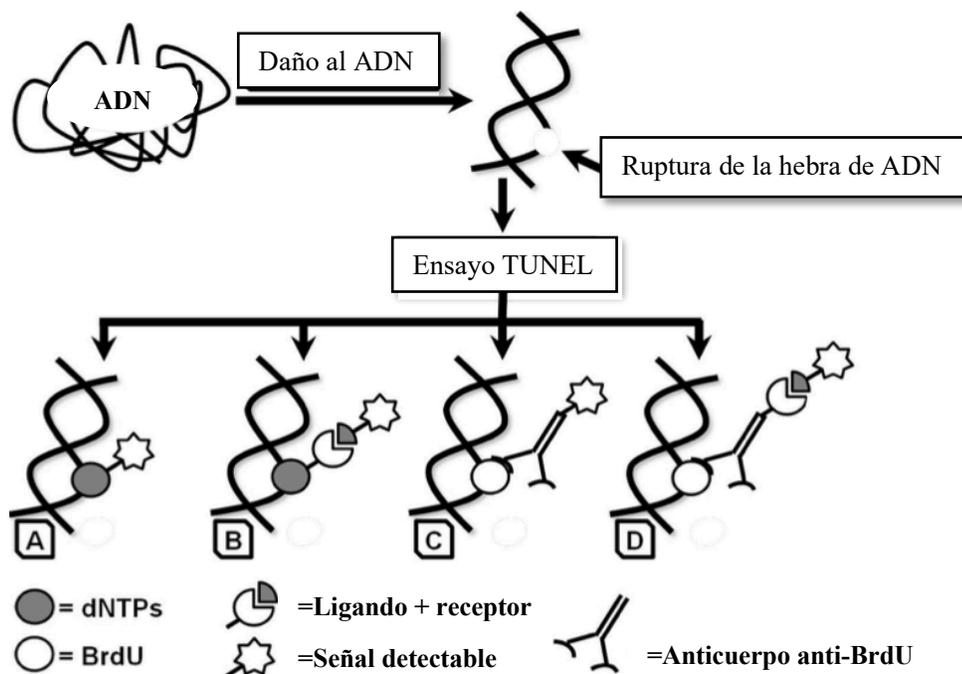


Figura 21. Opciones para el etiquetado de dNTPs en la reacción TUNEL. En A y B se muestran las opciones de etiquetado directo, que son: unión directa de una etiqueta a dNTP (a) y unión del receptor a dNTP (b). Este receptor es capaz de interactuar con el ligando, que está marcado de forma fluorescente o enzimática y permite la detección de roturas de cadenas de ADN. En (c) y (d) se muestran las posibilidades de etiquetado usando BrdU: unión directa de BrdU, que

*interactúa con anticuerpos anti-BrdU marcados con una etiqueta detectable (c); y unión de BrdU (d), que interactúa con anticuerpos anti-BrdU que están marcados a su vez con un receptor capaz de interactuar con el ligando. Ese ligando está marcado de forma fluorescente o enzimática y permite la detección de roturas de la cadena de ADN. Modificado de: (P. Majtnerová y T. Roušar, 2018).*

En el caso del marcaje directo por fluorescencia, es utilizada la proteína biotina que tiene afinidad por la avidina. Esta última proteína fue descrita en el artículo de Gorczyca et al. (1992) como una proteína que permite la detección de las rupturas de las cadenas de ADN al ser marcada con fluorescencia. Mientras que, por su parte, Gavrieli y col. (1992) analizaron a la avidina marcada con peroxidasa para emitir un marcaje colorimétrico en aquellas rupturas del ADN tras añadir un sustrato específico. En adición, se ha observado que el uso de digoxigenina también es útil en la estrategia del marcaje directo (B. Grasl-Kraupp, *et.al.*, 1995; F. Darío Cuello–Carrión y Daniel R. Ciocca, 1999).

Por otro lado, para el marcaje con BrdU es indispensable el uso de anticuerpos anti-BrdU, mismos que se marcan con *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) o con Alexa Fluor™ 488, emitiendo la señal una vez que el ligando se una a su receptor (Reagan-Shaw S, Ahmad N, 2005; Li X, Darzynkiewicz Z, 1995; Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H., 2008; H. Georg Kuhn, *et.al.*, 1996). Además del marcaje por BrdU, existe otro marcaje menos utilizado pero que también está basado en un análogo de timidina diferente, la 5'-etnil-2-desoxiuridina (EdU) (L. Wu, *et.al.*, 2012). En este caso, es necesario que se lleve a cabo la reacción de “clic” para que la EdU se pueda incorporar a los dNTP. La reacción de “clic” es una conjugación covalente del grupo etnilo de la EdU a la azida fluorescente catalizada por el cobre (F. Chehrehasa, *et.al.*, 2009). A diferencia del marcaje con BrdU, la incorporación de EdU no requiere la alteración de la estructura helicoidal del ADN gracias al pequeño tamaño de la azida fluorescente (S.B. Buck, *et.al.*, 2008). Principalmente, la técnica de marcaje de los dNTP junto con los fragmentos de la cadena de ADN depende de la finalidad del trabajo de investigación y de los requisitos del investigador. No obstante, es importante recalcar que, la detección de fluorescencia muchas veces va acompañada de otras técnicas como la citometría de flujo, citometría de barrido o la microscopía de fluorescencia (Li X, Darzynkiewicz Z, 1995; Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H, 2008; S. Ribeiro, *et.al.*, 2017; B. Grasl-Kraupp, *et.al.*, 1995; Y. Wang, *et.al.*, 2018; X. Ye, *et.al.*, 2017; K.J Kelly, *et.al.*, 2003).

### **6.1.2 Ventajas y desventajas del Ensayo de TUNEL**

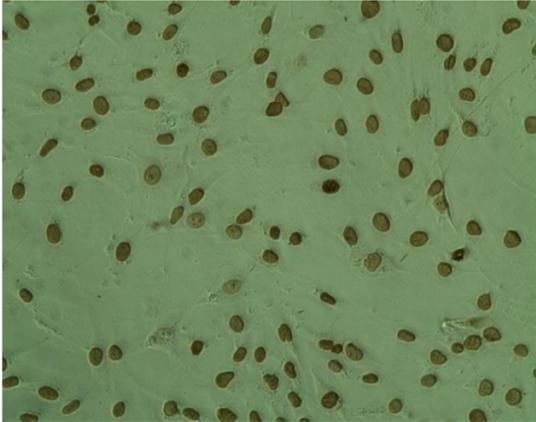
El ensayo de TUNEL es una de las técnicas aceptadas para detectar la apoptosis *in vitro* e *in situ*, ya que, al ser confirmada por otros métodos logra ser muy precisa. Esta técnica está considerada como uno de los métodos histoquímicos estándar más comunes para detectar y cuantificar células apoptóticas en líneas y suspensiones celulares y en tejidos en etapas posteriores de apoptosis. (S. Huerta, *et.al.*, 2007; K. Kyrylkova, *et.al.*, 2012). Es una técnica rápida que ha demostrado ser altamente sensible en comparación con el ensayo de escalera de ADN, dado que, precede a la aparición de la escisión internucleosomal del ADN detectada en el gel de agarosa (Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, 1992). Sin embargo, una desventaja muy relevante es que el ensayo de TUNEL no sólo detecta células apoptóticas, sino que, también es capaz de detectar células necróticas o aquellas que han sido dañadas por compuestos tóxicos, generando así, la posibilidad de obtener falsos positivos en los resultados del ensayo (B. Ansari, *et.al.*, 1993). Lamentablemente, el problema va más allá, dado que, se ha demostrado una falsa positividad en células sometidas a reparación activa del ADN, células sometidas a autólisis post-mortem y en células degenerativas que aparecen en el cerebro neonatal durante el desarrollo de un infarto agudo de miocardio (C. Torres, *et.al.*, 1997; M. Kanoh, *et.al.*, 1999; B. Grasl-Kraupp, *et.al.*, 1995). Gracias a estas observaciones, se ha llegado a la conclusión que el ensayo de TUNEL no es un método específico únicamente para la fragmentación del ADN por apoptosis. Por lo que, es indispensable la comparación de los resultados obtenidos con los resultados de otros métodos para poder afirmar la presencia de células apoptóticas. Otra gran desventaja de este método es que, a pesar de ser muy preciso, es una metodología cualitativa y subjetiva, costosa, que consume mucho tiempo si se requiere analizar grandes cantidades de muestra. Adicionalmente, no logra detectar los estadios tempranos del proceso apoptótico, por lo que, únicamente detecta células en estadio tardío (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007).

### **6.1.3 Componentes para el ensayo de TUNEL**

Existen diversos kits preestablecidos para el ensayo de TUNEL los cuales te proporcionan diferentes componentes, pero, básicamente proveen el tampón de equilibrio, la mezcla de nucleótidos biotinilados y la desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante (TdT). Adicionalmente, se necesitan los siguientes componentes básicos para poder llevar a cabo el procedimiento (K. Kyrylkova, *et.al.*, 2012).

- Bandeja de portaobjetos de histología.
- Rejilla deslizante.
- Incubadora.
- Cubreobjetos de plástico.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- Paraformaldehído al 4% en PBS.
- Proteinasa K, 10 mg / ml de reserva en Tris-HCl 100 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM; almacenar en alícuotas a -20 ° C.
- Tampón de equilibrio.
- Mezcla de reacción de TdT: agregue 98  $\mu$ m de tampón de equilibrio, 1  $\mu$ m de mezcla de nucleótidos biotinilados y 1  $\mu$ m de rTdT por 1 reacción (preparar suficiente mezcla de reacción para todas las reacciones experimentales y de control).
- Mezcla de control negativo: agregue 98  $\mu$ m de tampón de equilibrio, 1  $\mu$ m de mezcla de nucleótidos biotinilados y 1  $\mu$ m de dH<sub>2</sub>O esterilizado en autoclave por 1 reacción.
- SSC, solución madre 20x: NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M en dH<sub>2</sub>O, pH 4.5.
- PBST: PBS que contiene Tween 20 al 0.1%.
- SA-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) (puede usarse cualquier otro tipo de estreptavidina (SA) marcada para detectar dUTP biotinilado).
- Etanol al 100%, 95%, 70% y 50% en dH<sub>2</sub>O.
- Xileno.
- Medio de montaje DPX.
- Micro cubreobjetos.

**A.**



**B.**

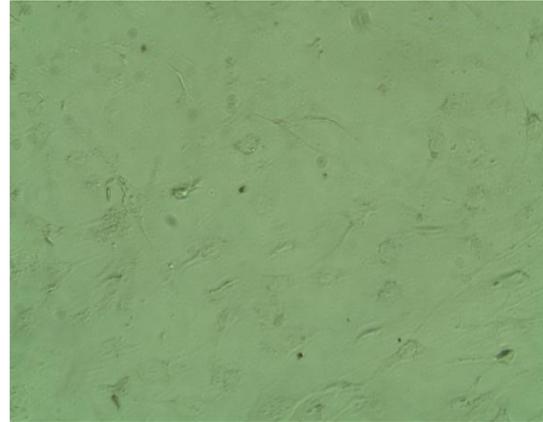


Figura 22. Kit de ScienCell™ para el ensayo de TUNEL aplicada a astrocitos humanos con (A) y sin (B) DNasa I. Los núcleos negros sólo se pueden observar en aquellas células tratadas con DNasa I. Esto sirve para identificar los controles positivos y negativos del ensayo. (ScienCell, s.f).

## 6.2 Anexina V

El ensayo de tinción con anexina V es otra prueba importante y de gran utilidad para contar el número de células que sufrieron apoptosis. El principio fundamental de esta técnica se basa en que naturalmente las células sanas tienen una naturaleza hidrofóbica debido a la expresión de fosfatidilserina en la membrana interna. Sin embargo, cuando una célula se encuentra bajo el proceso de apoptosis la membrana interna se invierte, convirtiéndose así en la membrana externa, y exponiendo a la fosfatidilserina. Así pues, para detectar la apoptosis las células son teñidas con anexina V y solución de yoduro de propidio (PI) seguido de un análisis de citometría de flujo. La anexina V detecta específicamente a la fosfatidilserina expuesta en la ahora membrana externa de las células y el yoduro de propidio tiñe las células necróticas. La diferencia entre una célula apoptótica y una necrótica para poder ser diferenciadas mediante el uso de esta técnica es que, las células necróticas presentan un contenido de ADN con “fugas”. Por tanto, una vez que se realiza el análisis de las células por medio de citometría de flujo se pueden observar diferentes resultados. Dentro de los posibles escenarios se encuentran las células negativas tanto a la anexina V como al yoduro de propidio, siendo estas células sanas; las células positivas contra anexina V y PI son necróticas y, finalmente, las positivas a la anexina V, pero negativas a PI son consideradas células apoptóticas (Figura 23) (I. Lakshmanan y S. K. Batra, 2013).

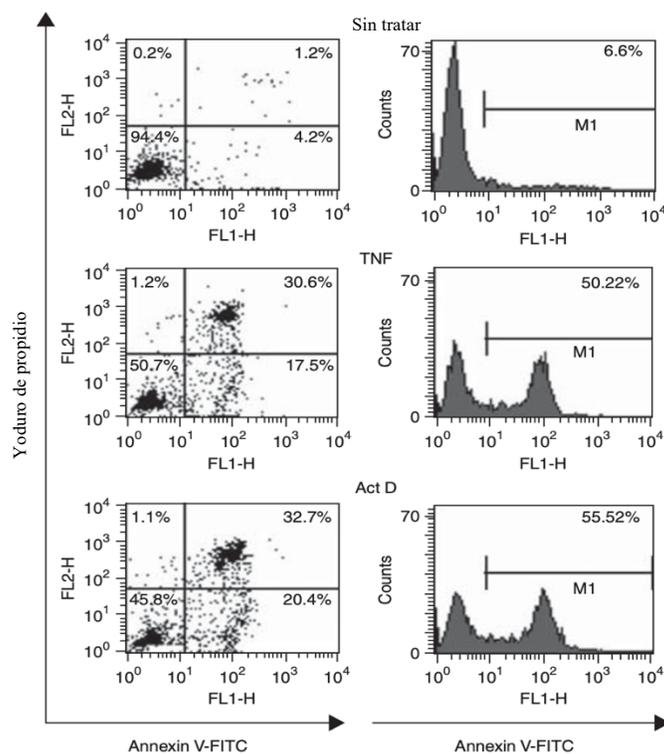


Figura 23. Ensayo de tinción doble de anexina V / yoduro de propidio (PI). Las células HeLa se trataron durante 12 h con 20 ng ml<sup>-1</sup> de TNF en combinación con 1 μM de cicloheximida (TNF), 1 μM de actinomicina D (Act D) o se dejaron sin tratar. Luego, las células se recolectaron e incubaron con anexina V-FITC recombinante a una concentración final de 1 μg ml<sup>-1</sup> durante 5 min a temperatura ambiente. Justo antes del análisis por citometría de flujo, se añadió PI a todas las muestras hasta una concentración final de 10 μg ml<sup>-1</sup>. En los paneles de la izquierda, se han analizado las células para determinar la unión de la anexina V, así como la captación de PI. En los paneles de la derecha, sólo se muestran los datos de unión de la anexina V para las mismas muestras. Se indica el porcentaje de células positivas para anexina V, positivas para PI o doble positivas tanto para anexina V como para PI. Modificado de: (S. E. Logue, et al., 2009).

La anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a la fosfatidilserina expuesta en la membrana externa de las células que sufren apoptosis. Esta técnica es de las más reconocidas para poder identificar este proceso en células que presentan alteraciones membranales. Lo que la hace aún más efectiva es la combinación de esta proteína con un marcador catiónico de ADN no permeable a la membrana como lo es el yoduro de propidio (M. Martínez, 2009). Dando como resultado la diferenciación entre células no apoptóticas (anexina V negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V positivo / IP positivo) (P. Pozarowski et al., 2003; B. Zhivotovsky y S. Orrenius, 2001; P. Mukhopadhyay et al., 2007; J. P. Gasser et al., 2009).

### 6.2.1 Componentes y procedimiento para el ensayo con anexina V

Al igual que para el ensayo TUNEL, ya existen kits comerciales predeterminados que proporcionan los materiales y reactivos necesarios para poder llevar a cabo el procedimiento correctamente. Principalmente, los materiales y reactivos que incluyen los kits para poder realizar esta técnica son una solución de anexina V, solución de yoduro de propidio y un tampón de incubación. Adicionalmente, se requiere tripsina, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y tampón PBS (pH 7.4). Dentro del equipo necesario se encuentra un citómetro de flujo, una centrífuga y un matraz de cultivo T25, además de cualquier material adicional para manipular las células y los reactivos (I. Lakshmanan y S. K. Batra, 2013). Por otro lado, los pasos que se deben de llevar a cabo para realizar esta técnica según I. Lakshmanan y S. K. Batra (2013), son los siguientes.

1. Sembrar las células ( $1 \times 10^6$  células) en un matraz de cultivo T25 por triplicado para los experimentos.
2. Para los controles, sembrar las células en tres matraces de cultivo T25 diferentes. En el primero células sin teñir, en el segundo células con anexina V y en el tercero células con PI.
3. Incubar las células por 48 h.
4. Recoger el sobrenadante que contiene a las células apoptóticas y tripsinizar a las adherentes ( $\sim 2 \times 10^6$  células) de todos los matraces. Se deben de combinar ambas células para resultar en un total de seis tubos.
5. Lavar las células recolectadas dos veces con PBS y centrifugarlas a ( $670 \times g$ , 5 min, RT).
6. Se deben de resuspender los sedimentos ( $\sim 2 \times 10^6$  células) en PBS (400  $\mu$ l).
  - a. Células experimentales (triplicado)  $\rightarrow$  (400  $\mu$ l de células + 100  $\mu$ l de tampón de incubación con 2  $\mu$ l de anexina [1 mg / ml] y 2  $\mu$ l de yoduro de propidio [1 mg / ml]).
  - b. Celdas de control.
    - i. Control 1: (sin teñir)  $\rightarrow$  (400  $\mu$ l de células + 100  $\mu$ l de tampón de incubación).

- ii. Control 2: (sólo anexina V) → (400 µl de células + 100 µl de tampón de incubación con 2 µl de anexina (1 mg / ml)).
- iii. Control 3: (sólo yoduro de propidio) → (400 µl de células + 100 µl de tampón de incubación con 2 µl de yoduro de propidio (1 mg / ml)).

7. Analizar las células sin lavarlas usando un citómetro de flujo.

Es importante tomar en cuenta algunas consideraciones adicionales para que la unión de anexina V a la fosfatidilserina sea exitosa. Por ejemplo, para evitar falsos positivos las células que serán teñidas con anexina V no deben estar previamente fijadas ni permeabilizadas con agentes como para-formaldehído o metanol. Esta consideración también debe de estar presente al momento de recolectar las células adherentes, debido a que la tripsinización agresiva o la manipulación de células, como rasparlas al intentar separarlas, puede dañar la membrana plasmática y generar falsos positivos. Otra consideración importante es la concentración de calcio. Para que la anexina V se una eficazmente a la fosfatidilserina, la concentración de calcio debe de ser de 1 a 3 mM, por esto, es sumamente importante que el tampón que se utilice contenga calcio. Una medida estándar ideal de calcio para la mayoría de las células es de 1.8 mM, ya que, concentraciones más altas pueden provocar una unión inespecífica de la anexina V a diferentes fosfolípidos (S. E. Logue, *et.al.*, 2009).

Continuando con las consideraciones, el tampón de pH idealmente debe de tener un valor de 7.2, siempre debe de ser superior a 5, debido a que un pH por debajo de esta cifra ocasiona que se pierdan propiedades de unión entre la fosfatidilserina y la anexina V. Finalmente, el último paso, pero no menos importante, es que se debe de titular cuidadosamente la concentración de anexina V-FITC. Este es el paso más importante porque demasiada o poca cantidad de anexina V-FITC puede dar como resultado la separación subóptima entre la población de células sanas y las apoptóticas en los ensayos de unión (S. E. Logue, *et.al.*, 2009).

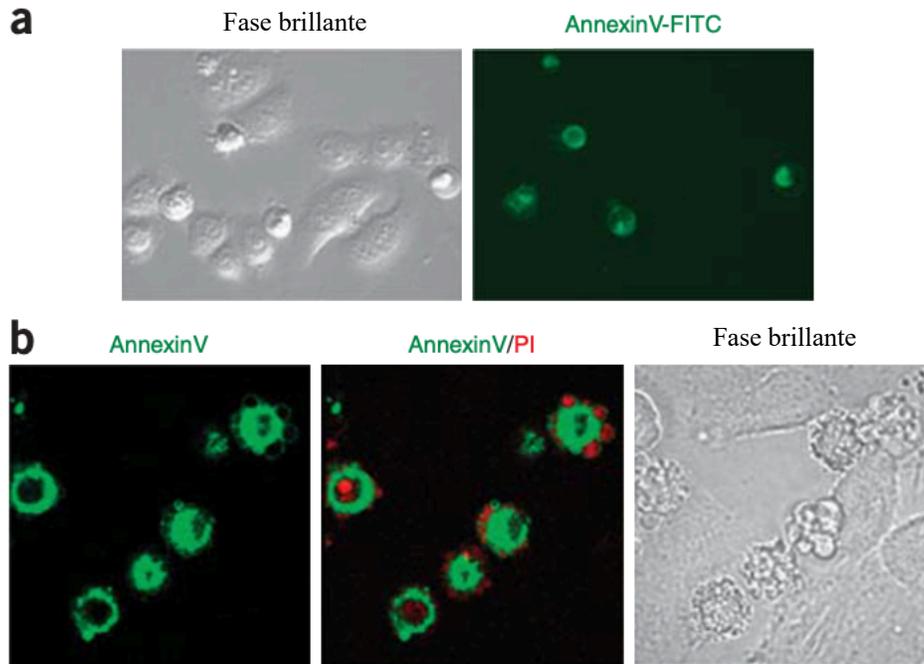


Figura 24. Tinción con anexina V / PI de células apoptóticas. Las células HeLa se trataron durante 12 h con  $20 \text{ ng ml}^{-1}$  de TNF en combinación con cicloheximida ( $1 \text{ mM}$ ). Las células se tiñeron con anexina V-FITC recombinante a una concentración final de  $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$  (a), o en combinación con PI a una concentración final de  $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  (b). Las células positivas para anexina V-FITC se tiñen de verde y las células positivas para PI se tiñen de rojo. Modificado de: (S. E. Logue, et.al., 2009).

### 6.2.2 Ventajas y desventajas

La tinción con anexina V + PI, al igual que el ensayo de TUNEL, es tanto una prueba cualitativa como cuantitativa que puede detectar a las células apoptóticas en estadio tardío. Pero, adicionalmente, la tinción con anexina V + PI identifica células apoptóticas en estadios tempranos y discrimina a la necrosis (M. Martínez, 2009). Otras ventajas adicionales de esta técnica es la rapidez en que se pueden obtener los resultados, así como su precisión y su alto nivel de confiabilidad. La tinción por anexina V requiere de una preparación mínima de la muestra, por lo que, no es necesaria una gran cantidad de reactivos. En cuanto a la evaluación de resultados se puede hacer por dos métodos diferentes, los cuales son, microscopía o análisis de citometría de flujo. Específicamente la microscopía permite observar cambios adicionales que presentan las células apoptóticas, como lo son, la fragmentación nuclear y la formación de ampollas en la membrana plasmática, fenómenos no observables en el análisis por citometría de flujo. No obstante, este último proporciona los resultados de manera más rápida y es un método altamente cuantitativo para evaluar la apoptosis. Además, en conjunto

con el yoduro de propidio, el citómetro de flujo puede diferenciar rápido y eficazmente una célula apoptótica de una necrótica (S. J. Martin, *et.al.*, 1995). En la Tabla 6 se muestra un listado de los diferentes tipos de células que pueden ser fácilmente detectadas por la unión de anexina V a su membrana cuando se encuentran en proceso de apoptosis.

Tabla 6. Selección de tipos de células donde la apoptosis se puede detectar fácilmente usando el ensayo de unión de anexina V. Modificada de: (S. E. Logue, *et.al.*, 2009).

<b>Tipo de célula</b>	<b>Referencia</b>
Linfocitos B	5
Linfoblastos T. Ej. Jukart	6
Linaje mielóide. Ej. THP-1, U937	25 y 26
Células de carcinoma de ovario. Ej. HeLa, SK-0V-3	27 y 28
Células embrionarias de riñón humano (HEK-293)	29
Células primarias humanas y murinos (MRC-5, MEF)	30 y 31
Células humanas no pequeñas de cáncer de pulmón (MR65)	32
Células humanas de melanoma (SKMel 1)	33
Hepatocitos humanos y murinos	34 y 35
Timocitos murinos	36
Fibroblastos murinos y simio. Ej. NIH-3T3 y COS	37 y 38
Células de ovario de hámster chino (CHO)	39
Células mesangiales glomerulares de rata	40

Una desventaja importante es que no suele ser una técnica muy económica. Por ejemplo, comprar a proveedores comerciales aproximadamente 100 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con anexina V puede costar hasta \$11 922. En adición, los estudios de imágenes *in vivo* que requieren anexina V normalmente requieren grandes cantidades de producto, lo que hace más costoso obtener la anexina V de los proveedores (S. E. Logue, *et.al.*, 2009).

### **6.3 Detección de las caspasas**

Tal como se mencionó con anterioridad, la apoptosis está altamente regulada por las caspasas, una familia de cisteína proteasas. Tanto la vía extrínseca como la intrínseca involucran la activación de caspasas. Por ejemplo, la vía de activación extrínseca es iniciada gracias a la unión de los receptores de la muerte a sus ligandos en la superficie celular, dando como

resultado la dimerización y activación de la caspasa 8. Por otro lado, la vía de activación intrínseca es estimulada por diferentes factores como el daño del ADN o estrés, resultando en la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9. Ambas caspasas son iniciadoras, lo que significa que, una vez activadas pueden dividirse y activar a otras caspasas, como la 3, 6 y 7. Estas caspasas son esenciales para la inactivación de sustratos e iniciar las vías de señalización que promueven la muerte celular (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016). Las caspasas son sintetizadas como enzimas inactivas, ocasionando que la medición de su expresión mediante el uso de anticuerpos no demuestre sus niveles de actividad (L. E. Edgington, *et.al.*, 2011; E. Due, *et.al.*, 2012; L. E. Sanman y M. Bodyo, 2014; S. Serim, *et.al.*, 2012). Por ejemplo, la caspasa 3 se encuentra en el citoplasma como un zimógeno de forma inactiva y es activada cuando es escindida por otras caspasas. La secuencia favorita de la caspasa 3 para la escisión es aspartato-glutamato-valina-aspartato (Nicholson and Thornberry, 1997)

### **6.3.1 Formas de medir los niveles de activación de las caspasas**

Un buen método para medir la actividad de las caspasas es con ayuda de sustratos fluorogénicos (L. E. Edgington, *et.al.*, 2011). Estos sustratos contienen una secuencia de péptidos basada en el sitio de escisión de cada caspasa y un fluoróforo. Una vez que la caspasa es activada corta el sustrato y se produce un cambio detectable en las propiedades fluorescentes del fluoróforo, así pues, la emisión fluorescente está relacionada directamente con los niveles de enzima activa (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016). Los sustratos están disponibles comercialmente y son vendidos específicamente para miembros individuales de la familia de las caspasas, no obstante, un sustrato particular puede ser mejor escindido por una caspasa que por otra. Por lo que, una desventaja de este método es que medir la actividad de una caspasa individual no es sencillo, lo que dificulta su interpretación (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016).

Otra interesante alternativa para medir la actividad de las caspasas es utilizar sondas basadas en actividad (ABPs). Estas son moléculas pequeñas que se unen irreversiblemente a las caspasas activadas. Estas sondas también cuentan con una secuencia de péptidos basada en el sitio de escisión para las caspasas y un fluoróforo (Figura 25A, B). La diferencia entre

ambos es que, las ABP cuentan con un grupo funcional conocido como ojiva (aciloximetilcetona) que se encarga de modificar covalentemente la enzima de forma dependiente de la actividad. Esto lo hace tras su unión selectiva al residuo de cisteína del sitio activo y, al ser una unión covalente, un ABP logra sobrevivir a las condiciones desnaturalizantes del método electroforético SDS-PAGE. Posteriormente, la fluorescencia generada por el fluoróforo es detectada utilizando un escáner láser de superficie plana. Una vez que las caspasas han sido marcadas con los ABP, se pueden analizar por SDS-PAGE fluorescente haciendo posible la identificación de las enzimas que conducen a la acumulación de fluorescencia *in vivo* (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016).

Los ABP permiten identificar caspasas específicas activas dentro de una muestra, además, pueden administrarse *in vivo*, permitiendo la identificación *in situ* de la actividad de las caspasas mediante la obtención de imágenes de la acumulación de fluorescencia en ratones vivos o tejidos extirpados (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016). Dos ejemplos de estas sondas son AB50 y LE22, ambas contienen un fluoróforo Cy5 y, la diferencia entre estas, son ligeros cambios en su región de especificidad de péptido y sus caspasas diana (L. Edgington, *et.al.*, 2009; L.E. Edgington, *et.al.*, 2012). Por ejemplo, AB50 presenta una secuencia Glu-Pro-Asp y se une a la caspasa 3 y 7 activas (Figura 25C). Mientras que, LE22 contiene una secuencia de péptidos Val-Glu-Ile-Asp y se une a la caspasa 6 activa, pero también a la 3 y 7 (Figura 25C) (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016). Es importante mencionar que, ambas sondas pueden sufrir una reactividad cruzada con otra cisteína conocida como legumain, no obstante, esto no es un gran problema debido a que todos los objetivos marcados pueden ser rastreados bioquímicamente (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016).

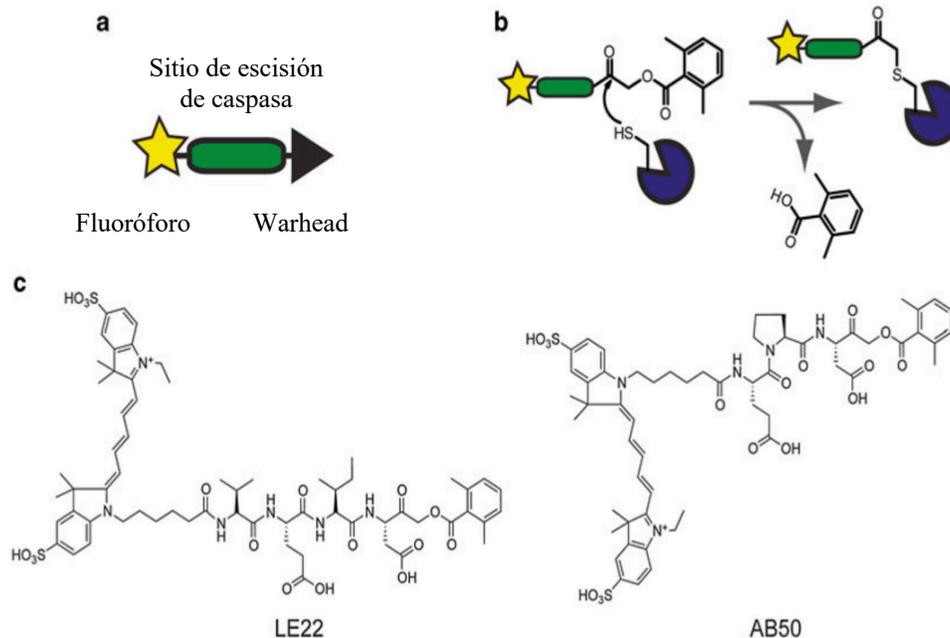


Figura 25. Sondas basadas en actividad para caspasas. (a) Esquema de las características clave de una sonda basada en actividades. (b) Mecanismo de una cisteína proteasa que se une a un ABP con una ojiva de aciloximetilcetona. (c) Estructuras de dos sondas basadas en actividad fluorescente para caspasas, AB50 y LE22. Modificado de: (L. E. Edgington-Mitchell y M. Bodyo, 2016).

### 6.3.2 Ventajas y desventajas

Un método por el cual se puede detectar a la caspasa 3 es mediante el uso de un marcador fluorescente utilizado para ensayos de enzimas fluorogénicas como el AFC (7-amino-4-trifluorometilcumarina), el cual es liberado una vez que la caspasa 3 es escindida. Una desventaja de este método es la necesidad de homogeneizar las células de los tejidos para liberar las enzimas, lo que genera la destrucción de la integridad del tejido haciendo imposible determinar el tipo de célula que sufre apoptosis. Además, usualmente se requieren grandes muestras de tejido para tener suficiente muestra y que sea posible detectar la actividad de la caspasa 3. Por otro lado, es un método consistente que permite la cuantificación rápida y es más utilizado para analizar el curso temporal de células en cultivo. Adicionalmente, es un buen método para analizar tejidos complejos que contienen diferentes tipos de células, pero sólo un tipo sufre cambios en el nivel de apoptosis (M. Watanabe, *et.al.*, 2002). La detección de los niveles de activación de las caspasas para identificar la apoptosis en células cuenta con las mismas ventajas que la técnica con anexina V. Es decir, es un método que discrimina a la necrosis, es un técnica cuantitativa y cualitativa que identifica células apoptóticas en estadios tempranos y tardíos (M. Martínez, 2009).

#### 6.4 Evidencia del funcionamiento del ensayo de TUNEL, anexina V y detección de caspasas con desintegrinas.

El primer ejemplo por analizar será la desintegrina MVD rubistatina, clonada de una glándula de veneno de *Crotalus ruber*. A partir de esta desintegrina se generó la rubastatina recombinante (r-Rub), sobre la cual, se midió su capacidad de inducir apoptosis en tres líneas celulares de cáncer humano diferentes. Estos cultivos celulares fueron SK-Mel-28 (líneas celulares de melanoma), HeLA (línea celular inmortal) y T24 (línea celular a partir de un paciente con cáncer de vejiga urinaria) (C. M. Carey, *et.al.*, 2012). Se utilizó el kit de detección de apoptosis *APO-BRDU TUNEL* y ensayos de fragmentación de cromatina para medir la capacidad del péptido r-Rub para inducir apoptosis en las diferentes líneas celulares. Para esto, todas las líneas celulares fueron incubadas con 2.5  $\mu$ M del péptido r-Rub por 24 h. Transcurrido el tiempo y mediante microscopía fluorescente y tinción Hoechst se observó la capacidad del péptido r-Rub de inducir la fragmentación de la cromatina sólo de las células de la línea SK-Mel-28 (C. M. Carey, *et.al.*, 2012). Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo de TUNEL para cuantificar la población de células SK-Mel-28 apoptóticas tras ser tratadas con el péptido r-Rub. Aquí los resultados obtenidos arrojaron que el 51.55%  $\pm$  5.28 de las células SK-Mel-28 tratadas sufrieron apoptosis (Gráfico 6), por lo que, se concluye que el péptido r-Rub tiene una actividad apoptótica estadística significativa ( $p < 0,005$ ) (C. M. Carey, *et.al.*, 2012).

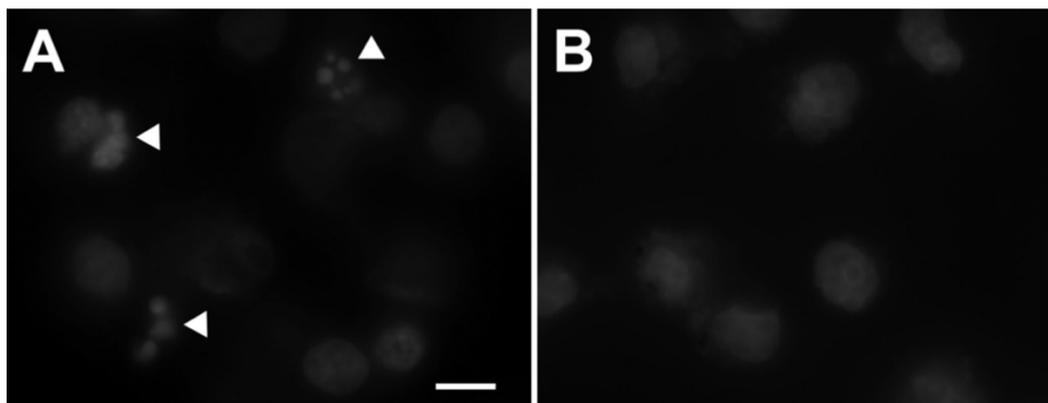


Figura 26. La fragmentación nuclear inducida por r-Rub de las células SK-Mel-28. (A) Células teñidas con Hoechst después del tratamiento con r-Rub 2.5  $\mu$ M durante 24 h (fragmentación de cromatina, puntas de flecha blancas). (B) Células no tratadas teñidas con Hoechst (C. M. Carey, *et.al.*, 2012).

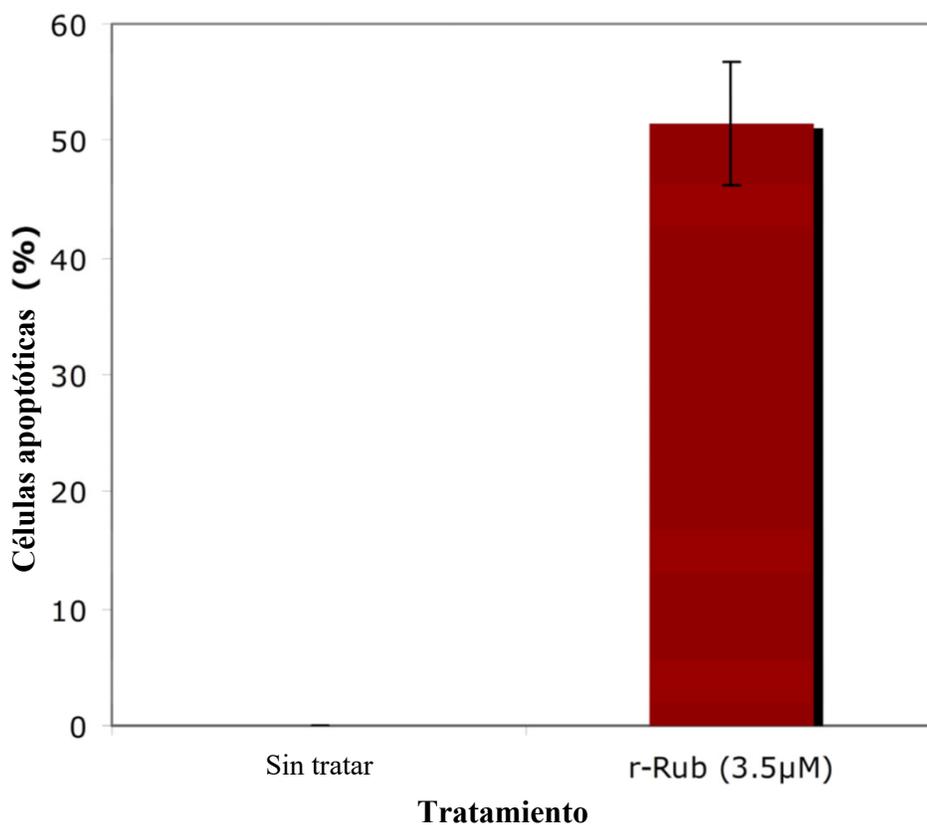


Gráfico 6. Apoptosis inducida por r-Rub de células SK-Mel-28. Las células se incubaron con 3.5 µM de péptidos r-Rub durante 18 h. Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos de desviación estándar se incluyen como barras. Modificado de: (C. M. Carey, et al., 2012).

Es difícil conocer con exactitud a qué receptor se dirige r-Rub para inducir apoptosis, sin embargo, se estudió al homólogo más cercano a r-Rub siendo la atrolisina E / D, el cual, inhibe al ADP y la agregación plaquetaria activada por colágeno (Shimokawa et al., 1998). Este hallazgo sugiere que la atrolisina E / D se une a los receptores de integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$  o  $\alpha_1\beta_1$  y, posiblemente r-Rub también lo haga debido a que igualmente inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP. No obstante, la línea celular SK-Mel-28 carece de  $\alpha_1\beta_1$ ; ambas líneas celulares, HeLa y SK-Mel-28 expresan  $\alpha_2\beta_1$ , pero se conoce que r-Rub no logró inducir la apoptosis en HeLa (Taklemariam et al., 2011; Seoane et al., 2010). Finalmente, se concluye que, r-Rub es un potente inductor de la apoptosis en células de la línea celular SK-Mel-28, pero no genera actividad apoptótica sobre las células de T24 ni HeLa. Además, es un inhibidor de la migración celular y la proliferación de SK-Mel-28, lo que desencadena la hipótesis de que la inhibición de la proliferación celular está relacionada con la apoptosis (C. M. Carey, et al., 2012).

Se realizó otro estudio en donde se analizó la capacidad de la desintegrina KTS obtustatina de inhibir a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  expresada en las células endoteliales y se observó su efecto sobre el desarrollo de melanoma experimental. Para esto, se utilizaron dos modelos animales que presentaron el melanoma, un ratón y una codorniz. Primero, fue necesario la inoculación de células B16F10 ( $1 \times 10^6$ ) o células MV3 ( $1 \times 10^7$ ) por vía subcutánea en el dorso de ratones C57BL / 6 o CD-1 Nu / Nu. Para ratones singénicos se esperó cuatro días a que los tumores se desarrollaran y crecieran, mientras que, para los ratones desnudos se esperó 7 días. Además, a estos últimos se les inyectó la obtustatina en la vena de la cola cada dos días en dos dosis de 5 mg / kg y 2.5 mg / kg por vía intravenosa. Los tumores se midieron todos los días con ayuda de un calibre de dial, determinando los volúmenes con la fórmula ancho  $2 \times$  largo  $\times 0.52$ . Es importante mencionar que, cada grupo estuvo conformado de cinco ratones y que para los grupos control se utilizó PBS inyectado. Para la medición de la apoptosis se utilizaron los tres métodos descritos en la metodología, es decir, ensayo de TUNEL, detección de anexina V y detección de caspasas (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

Para la detección de anexina V en células dHMVEC después del tratamiento con obtustatina se utilizó un kit de reactivos proporcionado por BD Biosciences, San Diego, CA, y, las muestras fueron analizadas durante una hora por citometría de flujo de doble color utilizando un citómetro de flujo EasyCyte (Guava, Hayward, CA). Asimismo, los experimentos realizados para la detección de la caspasa 3 y 8 se llevaron a cabo utilizando un kit ELISA colorimétrico brindado por BD Biosciences y un kit basado en isotiocianato de fluoresceína (FITC) proporcionado por Chemicon. Después, para poder leer la placa ELISA se utilizó un lector de placas ELISA EL  $\times$  800 (BioTek, Winooski, VT) a una longitud de onda única de 450 nm. Por último, la placa con muestras marcadas con fluoresceína se leyó por medio de un lector de placas fluorescentes FL  $\times$  800 (BioTek) (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

Finalmente, el silenciamiento del ARN del gen de la caspasa 3 en células dHMVEC se llevó a cabo en un medio sin suero mediante transfección, es decir, introducir ácidos nucleicos en células de mamíferos, con ARNip (75 pmol, Gene ID # 836, siRNA ID # s399, Applied Biosystem, Foster City, CA) usando Lipofectamine (Invitrogen) en Opti-MEM

medios de comunicación. Tras el paso de 72 horas realizando transfección, las células fueron separadas por tripsinización y algunas fueron tratadas con 2  $\mu$ M de obtustatina en el medio que contenía FBS al 2%. Después, las células fueron fijadas con para-formaldehído al 2% y se tiñeron con TUNEL utilizando un kit comercial de la marca Roche. Por último, utilizando el citómetro de flujo EasyCyte se hizo la detección de las células apoptóticas y, para el análisis de las caspasas 3 y 8 liberadoras realizado por Western blot se usaron anticuerpos específicos, adquiridos de Cell Signaling Inc., esto con el objetivo de reconocer la forma escindida de las caspasas (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

Ahora bien, en referencia a los resultados obtenidos, lo primero que se analizó fue el efecto de la obtustatina en la morfología de las células dHMVEC. Se observó un cambio significativo en la forma de las células tratadas con una alta concentración de obtustatina (2  $\mu$ M) en el medio de cultivo tisular que contenía todos los factores de crecimiento y PBS al 5%. Asimismo, estas células comenzaron a desprenderse, mostrando una morfología apoptótica típica (Figura 27A) (M. C. Brown, *et.al.*, 2008). Para poder medir las primeras etapas de apoptosis se utilizó el ensayo de anexina V, donde los datos revelaron que efectivamente la anexina V se une a la superficie de las dHMVEC tras el tratamiento con obtustatina, lo que ocasionó una pérdida de asimetría de fosfolípidos de membrana y exposición de la fosfatidilserina (G. Koopman, *et.al.*, 1994). La fosfatidilserina es reconocida por la anexina V y detectada por citometría de flujo (Figura 27B). Adicionalmente, se observó que efectivamente la obtustatina indujo apoptosis en las dHMVEC gracias a la vía de activación de las caspasas, ya que, el tratamiento resultó en la liberación de la caspasa 3 en dHMVEC, la cual fue detectada por el método ELISA colorimétrico y por transferencia Western blot (Figura 27C) (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

Gracias al silenciamiento del gen de la caspasa 3 por ARNip se confirmó que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  transfiere la señal proapoptótica a través de una vía dependiente de caspasa tras ser antagonizada por la obtustatina. Así pues, las células dHMVEC que contenían el gen de caspasa 3 silenciado fueron resistentes a la apoptosis inducida por la obtustatina, fenómeno que se pudo observar mediante los ensayos de TUNEL de citometría de flujo y la transferencia de Western blot (Figura 27C). Por otro lado, la caspasa 8 participa en la vía

extrínseca de la apoptosis y es activada tras la unión de la obtustatina a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en dHMVEC. Para detectar a la caspasa 8 se realizó un lisado de células previamente tratadas con obtustatina por medio de ELISA fluorescente y transferencia Western blot (Figura 27D). Sin embargo, la obtustatina no mostró propiedades apoptóticas en las líneas celulares de melanoma humano y ratón, MV3 y B16F10, a pesar de que ambas líneas celulares expresan a la integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Finalmente, el análisis de secciones de parafina tomadas del tejido tumoral mostró una tinción positiva de rupturas de la hebra de ADN (reacción TUNEL) en las células endoteliales de muestras de cáncer aisladas de animales tratados con obtustatina (Figura 28) (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

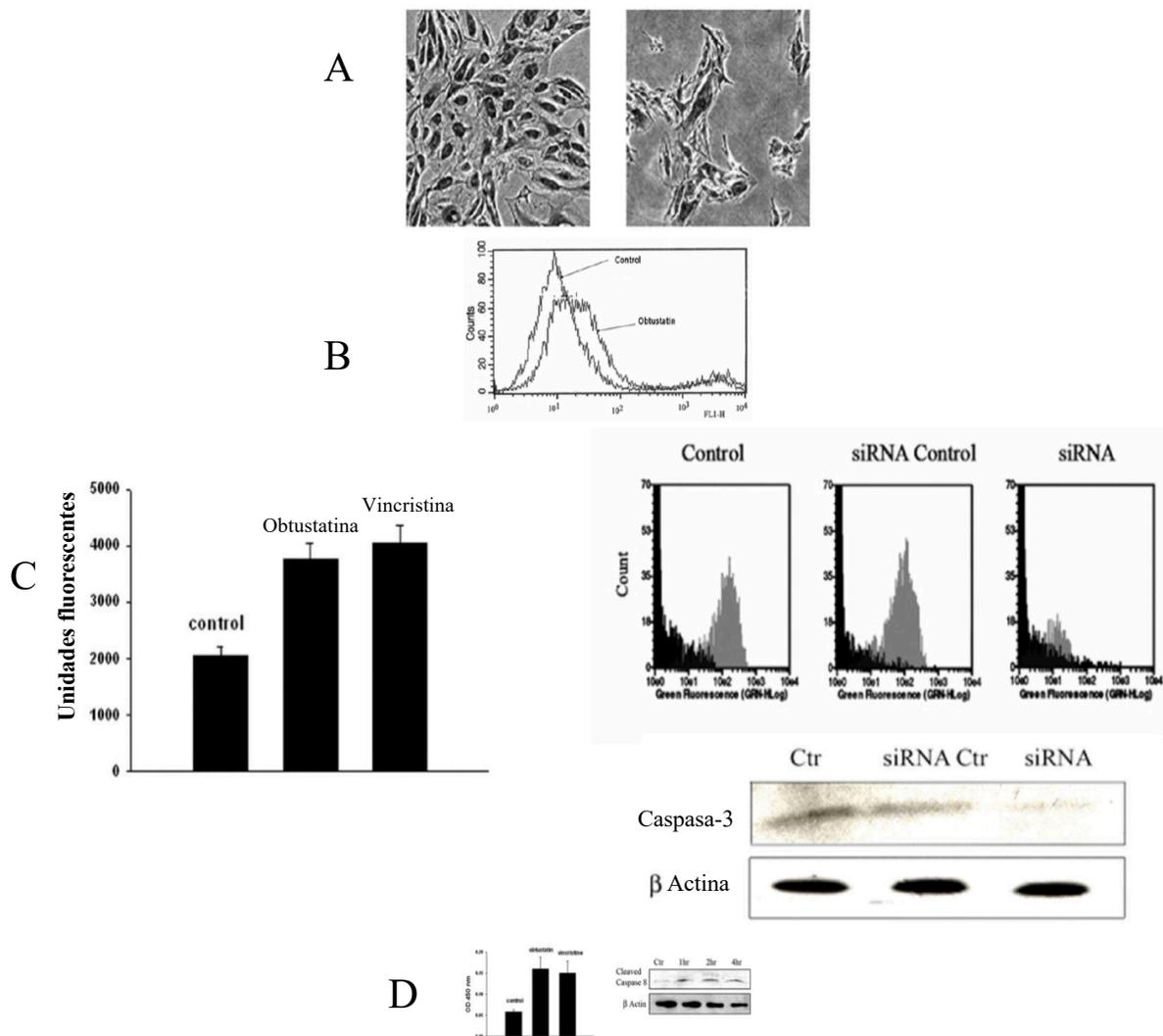


Figura 27. Inducción de apoptosis por obtustatina en dHMVEC. (a) Cambios morfológicos de dHMVEC en cultivo tratado o no con obtustatina. Las células se cultivaron en una placa de 6 pocillos hasta una confluencia del 90% y se trataron con obtustatina 2  $\mu$ M. La incubación se realizó en medio EBM-2 completo durante 24 horas y después de lavar con PBS las células se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las células se analizaron mediante observación microscópica de fase de contraste con un aumento de 200x. (b) Detección de la etapa temprana de apoptosis inducida por obtustatina en dHMVEC

probando la unión de anexina V-FITC en citometría de flujo. (c) Efecto de la obtustatina sobre la generación de caspasa 3 en dHMVEC. Para ELISA, las células se cultivaron en medio completo durante 16 horas en presencia o ausencia de obtustatina (2  $\mu$ M) o vincristina (50  $\mu$ g / ml). Las células se lisaron y se detectó la caspasa 3 liberada usando un kit de ensayo de ELISA colorimétrico (BD Bioscience). El ensayo TUNEL para análisis de citometría de flujo se realizó para dHMVEC con gen de caspasa 3 silenciado usando ARNip específico. Después de 72 horas de transfección, las células se separaron, se trataron con obtustatina 2  $\mu$ M durante 2 horas y se mezclaron con reactivos TUNEL. Las áreas grises de los gráficos presentan histogramas FACS para muestras tratadas con obtustatina, mientras que las áreas negras controlan muestras no tratadas. El análisis de transferencia Western blot para dHMVEC con caspasa 3 silenciada se realizó mediante el tratamiento de las células adheridas con obtustatina 2  $\mu$ M durante 2 horas, después de la lisis de las células y la separación del lisado en SDS-PAGE en gel reducido. Las proteínas del gel se transfirieron eléctricamente a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 primario. Las bandas se visualizaron usando un kit de detección Western blot quimioluminiscente. (d) Efecto de la obtustatina sobre la generación de caspasa 8 en dHMVEC. La detección de caspasa 8 se realizó usando un kit de fluorescencia (panel derecho). Las células se trataron en el cultivo con obtustatina 2  $\mu$ M durante 2 horas, y luego se añadieron los reactivos del kit de detección de caspasa 8 basados en FITC. Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos, que se leyó utilizando un lector de placas de fluorescencia. Las barras de error representan S.D. de tres experimentos. Las diferencias entre los grupos de control y los inductores de apoptosis fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ). La detección de caspasa 8 mediante transferencia Western blot se realizó en dHMVEC mediante tratamiento de células en el cultivo con obtustatina 2  $\mu$ M en diferentes puntos de tiempo. Los lisados de células se analizaron como se describe para la caspasa 3. Modificado de: (M. C. Brown, et.al., 2008).

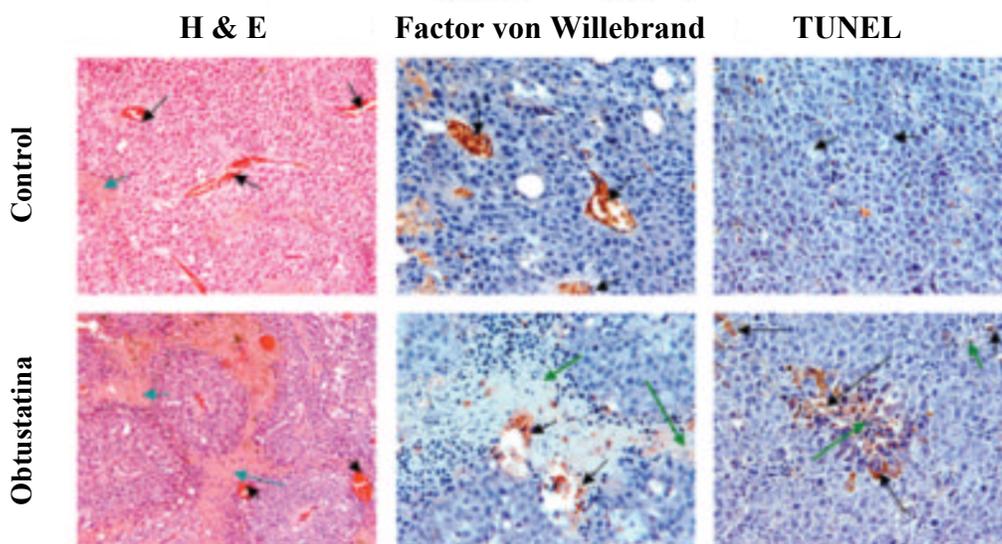


Figura 28. Inmunohistoquímica de secciones en parafina de melanoma de ratón B16F10. Imágenes representativas de secciones de tejido de control y melanoma B16F10 tratado con obtustatina. Las flechas negras indican vasos, las flechas verdes indican manchas necróticas. Modificado de: (M. C. Brown, et.al., 2008).

A manera de conclusión referente a este ensayo, se considera que la capacidad de la obtustatina a inhibir el crecimiento del melanoma está relacionada con su actividad antiangiogénica. Se demostró claramente que la obtustatina bloquea altamente la proliferación de las células endoteliales, lo cual es un efecto independiente del tipo de agonista utilizado. También, se reveló que es un gran inductor de apoptosis en las células endoteliales, principalmente mediante la activación de la vía extrínseca que depende de la

caspasa 8. A pesar de que la vía extrínseca fue la más analizada en este ensayo experimental, no se descarta la posibilidad de que la vía mitocondrial también pueda ser activada por la desintegrina obtustatina. Adicionalmente, gracias al ensayo de citometría de flujo de TUNEL se observó que la obtustatina indujo apoptosis en células suspendidas ya desprendidas (M. C. Brown, *et.al.*, 2008).

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial, mientras que, en el continente americano se encuentra en segundo lugar. A nivel nacional, el cáncer es la tercera causa de muerte en la población, siendo el cáncer de pulmón el segundo tipo de cáncer más común en el país justo por debajo del cáncer de mama. A lo largo del tiempo, se han realizado diversos estudios para comprender la fisiología y anatomía del cáncer, así como las principales causas y los posibles tratamientos para mejorar la calidad de vida de miles de pacientes de diferentes edades. Si bien, existen diferentes terapias y medicamentos ya aprobados para tratar el cáncer de pulmón. No obstante, estos tratamientos suelen ser muy invasivos en los pacientes provocando que estos tengan una calidad de vida deficiente. Actualmente, la investigación se ha enfocado en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos que tengan mayor especificidad y efectividad para combatir el cáncer de pulmón, con la intención de que produzcan los menores efectos secundarios posibles en los pacientes.

Las desintegrinas son moléculas provenientes de venenos de serpientes que han mostrado una alta actividad para inhibir la adhesión celular, la migración celular y la angiogénesis. Sin embargo, también se han encontrado desintegrinas con un gran potencial para generar apoptosis en células cancerígenas, lo que abre la puerta a la posibilidad de desarrollar medicamentos basados en desintegrinas como coadyuvantes contra el cáncer. Actualmente, ya existen algunas moléculas de venenos de serpiente muy bien estudiadas de las cuales se conoce su funcionamiento para combatir algunas enfermedades. Por ejemplo, el Captopril® es el primer fármaco aprobado por la FDA en 1979 aislado de veneno de serpiente y funciona para tratar la hipertensión arterial. Adicionalmente, se encuentran en el mercado dos agentes antiplaquetarios provenientes de venenos de serpientes que ya fueron aprobados por la FDA y que son utilizados como terapia para el síndrome de isquemia coronaria aguda y para complicaciones trombóticas (D. Vivas, R. Inga y A. Yarlequé, 2012). Tirofiban (Aggrastat®), es desarrollado a partir de la desintegrina echistatina aislada del veneno de serpiente *Echis carinatus* y, eptifibatide (Integrillin®), partiendo de la desintegrina basbourina obtenida del veneno de serpiente *Sistrurus miliarius barbouri* (Chen *et al.*, 1991; Saudek *et al.*, 1991; Scarborough *et al.*, 1991).

No obstante, hasta la fecha no existe un medicamento aprobado específicamente para tratar algún tipo de cáncer que esté basado en desintegrinas provenientes de venenos de serpientes. Además, existen escasos estudios en los cuales se analizan los venenos de especies mexicanas como las *Crotalus*, a pesar de que se han encontrado algunas especies que pueden ser prometedoras para protocolos o estudios clínicos. Esto permite ampliar el panorama de estudio para el descubrimiento de nuevos conocimientos relacionados con el tema que resulten en nuevos tratamientos.

Ahora bien, tal como se observó en la metodología, existen diferentes pruebas que permiten conocer la actividad apoptótica de una molécula *in vitro*. Particularmente, en esta revisión bibliográfica se analizaron el ensayo de TUNEL, el ensayo de anexina V y el ensayo de detección de caspasas. Todos son relativamente sencillos de realizar dentro del laboratorio debido a que en el mercado se encuentran disponibles diferentes kits que te proporcionan la mayoría de los materiales que se requieren para llevar a cabo estas técnicas, lo restantes son fáciles de conseguir o inclusive están siempre disponibles en un laboratorio experimental. Una vez que se obtienen los resultados estos pueden ser analizados ya sea por citometría de flujo o por fluorescencia. Claro está que, todas cuentan con sus respectivas ventajas y desventajas, sin embargo, estas son las técnicas más utilizadas dentro del laboratorio debido a su gran confiabilidad para medir los niveles de apoptosis *in vitro* o *in vivo*. Además, ya se ha obtenido evidencia de algunas desintegrinas que en efecto causan la apoptosis en algunas líneas celulares de diferentes tipos de cáncer y que, los resultados se obtuvieron mediante alguna de estas técnicas mencionadas anteriormente o incluso donde las tres fueron utilizadas en conjunto para confirmar los resultados. A pesar de ello, no se cuenta con estudios enfocados al desarrollo de una terapia contra el cáncer de pulmón que se base en desintegrinas provenientes de venenos de serpientes mexicanas. Existe una amplia variedad de especies de las cuales se podrían purificar diferentes desintreginas y analizar sus niveles de apoptosis mediante alguna de estas técnicas. Esto con la finalidad de encontrar alguna desintegrina prometedora que pueda ser probada *in vitro* y, en caso de ser efectiva y segura *in vivo*, para buscar terapias alternativas menos agresivas contra el cáncer de pulmón o que sirvan como coadyuvantes a las ya existentes.

## 8. CONCLUSIÓN

A manera de conclusión, tras realizar una revisión bibliográfica exhaustiva, las desintegrinas son moléculas que han mostrado tener la capacidad de inducir apoptosis en células tras la fuerte unión a ciertas integrinas presentes en la superficie celular. Estas moléculas ya han sido estudiadas y probadas en distintas líneas celulares de cáncer para medir su efectividad ante la eliminación de células cancerígenas y deteniendo la metástasis. A pesar de que se sabe que sí tienen un efecto positivo sobre la apoptosis, hace falta profundizar en el tema como, por ejemplo, analizar venenos de serpientes de diferentes especies y regiones como las que habitan en un país megadiverso como lo es México. Por otra parte, es necesario realizar estudios sobre el mecanismo de acción y los efectos de desintegrinas en líneas celulares de cáncer de pulmón con la finalidad de buscar nuevas terapias para esta enfermedad y así ampliar el panorama de opciones. Por último, existen diferentes técnicas que se encargan de medir los niveles de apoptosis de una molécula en el laboratorio. Dichas técnicas son fáciles de realizar, pero se debe tener en cuenta sus ventajas y desventajas. Pese a que, todas contribuyen al análisis del proceso apoptótico en células, lo más recomendable siempre es corroborar los resultados obtenidos mediante al menos dos ensayos diferentes.

## 9. REFERENCIAS

- A. Meneses, et. al. (2019). Programa integral de prevención y control de cáncer. 05 octubre 2020, de Academia Nacional de Medicina de México Sitio web: <https://www.anmm.org.mx/actas2019/SE-20-marzo-2019.pdf>
- A.A.Valencia. (2006). Taxonomía y distribución del género *Crotalus* (Linneo, 1758) en el estado de Hidalgo. 03 julio 2021, de UAEH Sitio web: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10486/Taxonomia%20y%20distribucion%20del%20genero.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Abdel-Ghany, M., Cheng, H. C., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (2001). The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. 30 agosto 2021, de The Journal of biological chemistry, SitioWeb: <https://www.jbc.org/action/showPdf?pii=S0021-9258%2820%2979634-1>
- Abdel-Ghany, M., Cheng, H. C., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (2002). Focal adhesion kinase activated by beta (4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. 30 agosto 2021, de The Journal of biological chemistry, SitioWeb: <https://www.jbc.org/action/showPdf?pii=S0021-9258%2820%2974340-1>
- American Thoracic Society. (2014). Lung Cancer. 06 octubre 2020, de American Thoracic Society Sitio web: <https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/lung-cancer-intro.pdf>
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA (1993) In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. 10 julio 2021, de PubMed, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8326456/>
- Aplin, A. E., Howe, A. K., & Juliano, R. L. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. 30 agosto 2021, de PubMed SitioWeb: [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00045-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00045-9)

- Arruda Macêdo, J. K., Fox, J. W., & de Souza Castro, M. (2015). Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. 30 agosto 2021, de Current protein & peptide science, SitioWeb: <https://doi.org/10.2174/1389203716666150515125002>
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., & Varner, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. 30 agosto 2021, de NCBI. SitioWeb: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2577722/pdf/nihms-73917.pdf>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. Cell and tissue research. 30 agosto 2021, de PubMed SitioWeb: <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Berman, A.E., Kozlova, N.I. & Morozevich, G.E. (2003). Integrins: Structure and Signaling. 30 agosto 2021 de Biochemistry (Moscow) Sitio Web: <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000011649.03634.74>
- Bischoff J. (1997). Cell adhesion and angiogenesis. 10 septiembre 2021, de The Journal of clinical investigation, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507807/pdf/990373.pdf>
- Brooks, P. C., Clark, R. A., & Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. 10 septiembre 2021, de Science (New York, N.Y., Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7512751/>
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., & Cheresh, D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. 10 septiembre 2021, de Cell, Sitio Web: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(94\)90007-8.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494900078%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(94)90007-8.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494900078%3Fshowall%3Dtrue)
- Brown, M. C., Staniszevska, I., Del Valle, L., Tuszyński, G. P., & Marcinkiewicz, C. (2008). Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. 30 septiembre 2021, de international journal of cancer, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2587450/>
- Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A (2008) Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. 10 julio 2021, de Biotechniques SitioWeb: <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/000112812>
- C. Hsin Yeh, *et al.* (1998). Accutin, a New Disintegrin, Inhibits Angiogenesis In Vitro and In Vivo by Acting as Integrin  $\alpha v \beta 3$  Antagonist and Inducing Apoptosis. 10 septiembre 2021, de Elsevier Sitio web: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497120578762?token=E14DA2920EA817D859ED4AC1A64A22E843807318D2B8645714A2E0A23A5916FCEA11B4CC883CAB16E715B90A636F2FB3&originRegion=us-east-1&originCreation=20210921211150>
- C. J. Carranza-Aguilar, *et al.* (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. 20 marzo 2021, de El Residente Sitio web: <https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2020/rr203c.pdf>
- C. M. Carey, R. Bueno, D. A. Gutierrez, C. Petro, S. E. Lucena, E. E. Sanchez, & J. G. Soto (2012). Recombinant rubistatin (r-Rub), an MVD disintegrin, inhibits cell migration and proliferation, and is a strong apoptotic inducer of the human melanoma cell line SK-Mel-28. 29 septiembre 2021, de Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3282178/>
- C. Ortega, *et al.* (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. 10 octubre 2020, de Gac Méd Méx Sitio web: [https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864\\_2007/2001-137-6-563-577.pdf](https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/2001-137-6-563-577.pdf)
- C. Torres, Munell F, Ferrer I, Reventos J, Macaya A (1997) Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the 858 hypoxic-ischemic neonatal rat brains. 10 julio 2021, de PubMed SitioWeb: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9259449/>
- Cancer.net. (2019). What is Metastasis? 11 junio 2021, de Cancer.net Sitio web: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-metastasis>
- Cancer.net. (2019). What is Metastasis? 11 junio 2021, de Cancer.net Sitio web: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>
- Chang CY, Li JR, Wu CC, Wang JD, Yang CP, Chen WY, 47. Wang WY, Chen CJ (2018) Indomethacin induced glioma apoptosis involving ceramide signals. 10 julio 2021, de ScienceDirect SitioWeb: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482718300934?via%3Dihub>
- Chehrehasa F, Meedeniya AC, Dwyer P, Abrahamsen G, Mac-kay-Sim A (2009) EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. 10 julio 2021, de PubMed SitioWeb: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996411/>
- Chen, Y., Pitznerberger, S. M., Garsky, V. M., Lumma, P. K., Sanyal, G., & Baum, J. (1991). Proton NMR assignments and secondary structure of the snake venom protein echistatin. 18 octubre 2021, de Biochemistry, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1661142/>

- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT 735 (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation 736 evaluation in human sperm. 10 julio 2021, de J Andrology Sitio Web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2164/jandrol.05068>
- Cuello-Carrion FD, Ciocca DR (1999) Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique. 10 julio 2021, de JHC Sitio Web: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/002215549904700614>
- Cundall, D., Wallach, V. and Rossman, D. A. 1993. The systematic relationships of the snake genus *Anomochilus*. Zoological Journal of the Linnean Society 109: 275-299. Sitio Web: <https://www.researchgate.net/publication/227766378> The systematic relationships of the snake *Anomochilus*
- D. Vivas, R. Inga, A. Yarlequé. (2012). USO POTENCIAL DE COMPONENTES DEL VENENO DE SERPIENTE EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. 01 abril 2020, de Rev Peru Med Exp Salud Publica Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v29n3/a17v29n3.pdf>
- D. Vivas, R. Inga, A. Yarlequé. (2012). Uso potencial de componentes del veneno de serpiente en el tratamiento del cáncer. 18 octubre 2021, de Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica Sitio web: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342012000300017](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000300017)
- D.M. Paredes-García, A. Ramírez-Bautista y M.A. Martínez-Morales. (2011). Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. 03 julio 2021, de SciELO Sitio web: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v82n2/v82n2a26.pdf>
- Danen, E. H., Marcinkiewicz, C., Cornelissen, I. M., van Kraats, A. A., Pachter, J. A., Ruiter, D. J., Niewiarowski, S., & van Muijen, G. N. (1998). The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. 30 agosto 2021, de Experimental cell research, Sitio Web: <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3821>
- Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H (2008) Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. 10 julio 2021, de ScieceDirect Sitio Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202307002174?via%3Dihub>
- Deu, E., Verdoes, M., & Bogyo, M. (2012). New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. 10 octubre 2021 de, Nature structural & molecular biology, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22218294/>
- E. PALACIOS, M. J. MIRÓ, C. Boticario. (2011). MUERTE CELULAR Y CÁNCER: LAS VÍAS DE LA APOPTOSIS Y DE LA AUTOFAGIA COMO DIANAS EN LA TERAPIA DEL CÁNCER. 01 abril 2020, de Anales de la Real Academia de Doctores de España Sitio web: <https://www.radoctores.es/doc/1V15N2-palacios-muertecelular.pdf>
- E.A. Rivas-Mercado, L. Garza-Ocañas. (2017). Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. 15 abril 2021, de ELVESIER Sitio web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmu.2017.02.004>
- Edgington-Mitchell, L. E., & Bogyo, M. (2016). Detection of Active Caspases During Apoptosis Using Fluorescent Activity-Based Probes. 09 octubre 2021, de Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6091214/>
- Edgington, L. E., van Raam, B. J., Verdoes, M., Wierschem, C., Salvesen, G. S., & Bogyo, M. (2012). An optimized activity-based probe for the study of caspase-6 activation. 10 octubre 2021 de, Chemistry & biology, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314226/>
- Edgington, L. E., Verdoes, M., & Bogyo, M. (2011). Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. 10 octubre 2021 de, Current opinion in chemical biology, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098719/>
- Edgington, L., Berger, A., Blum, G. et al. (2009). Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes. 10 octubre 2021 de, de Nat Med, Sitio Web: <https://www.nature.com/articles/nm.1938#citeas>
- Elizabeth C Ledgerwood e Ian M Morison. (2009). Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy. 30 agosto 2021, de PubMed Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19147745/>
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 09 julio 2021, de Toxicologic Pathology Sitio Web: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1080/01926230701320337>
- F. Salamanca Gómez. (2009). Células troncales, cáncer y p53. 10 octubre, de Gac Méd Méx Sitio web: [https://www.anmm.org.mx/GMM/2009/n5/76\\_vol\\_145\\_n5.pdf](https://www.anmm.org.mx/GMM/2009/n5/76_vol_145_n5.pdf)
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. 30 agosto 2021 de, international journal of cancer Sitio Web: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. 10 septiembre 2021, de The Journal of biological chemistry. Sitio Web: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)49853-0/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)49853-0/pdf)

- Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., & Cheresh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. 10 septiembre 2021, Science (New York, N.Y., Sitio Web: [https://www.science.org/doi/10.1126/science.270.5241.1500?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/science.270.5241.1500?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed)
- Gasser, J. P., Hehl, M., & Millward, T. A. (2009). A homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for phosphatidylserine exposure on apoptotic cells. 05 octubre 2021, de Analytical biochemistry, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835236/>
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. 10 julio 2021, de PubMed Sitio Web: <https://rupress.org/jcb/article-pdf/119/3/493/1063580/493.pdf>
- GLOBOCAN. (2020). Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. 12 junio 2021, de GLOBOCAN Sitio web: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0)
- Gobierno de México. (2020). Detección y diagnóstico - Cáncer de Pulmón (Células pequeñas). 15 junio 2021, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.infocancer.org.mx/?t=deteccion-diagnostico-cancer-pulmon-celulas-pequenas>
- GORCZYCA, W., BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, R., GONG, J., & DARZYNKIEWICZ, Z. (1992). DNA STRAND BREAKS OCCURRING DURING APOPTOSIS - THEIR EARLY INSITU DETECTION BY THE TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE AND NICK TRANSLATION ASSAYS AND PREVENTION BY SERINE PROTEASE INHIBITORS. 10 julio 2021, International Journal of Oncology, Sitio web: <https://doi.org/10.3892/ijo.1.6.639>
- Grasl-Kraupp B, Ruttikay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. 10 julio 2021, de ScienceDirect, SitioWeb: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0270913995900713?via%3Dihub>
- Gupta, S. K., Oommen, S., Aubry, M. C., Williams, B. P., & Vlahakis, N. E. (2013). Integrin  $\alpha 9\beta 1$  promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. 30 agosto 2021, de NCBI SitioWeb: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.41>
- H. Juhl, E. C. Petrella, N.-K. V. Cheung, R. Bredehorst, and C.-W. Vogel, (1990). "Complement killing of human neuroblastoma cells: a cytotoxic monoclonal antibody and its F(ab)'2-cobra venom factor conjugate are equally cytotoxic," Molecular Immunology, vol. 27, no. 10, pp. 957-964. Sitio Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016158909090118J>
- Hailey, S., Adams, E., Penn, R., Wong, A., & McLane, M. A. (2013). Effect of the disintegrin eristostatin on melanoma-natural killer cell interactions. 30 agosto 2021, de Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.011>
- Hammes, H. P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A., & Preissner, K. T. (1996). Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. 10 septiembre 2021, de Nature medicine, Sitio Web: <https://www.nature.com/articles/nm0596-529>
- He, B., Lu, N., & Zhou, Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. Current opinion in cell biology, 21(6), 900-912. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.008>
- Higuchi, D.A.; Almeida, M.C.; Barros, C.C.; Sanchez, E.F.; Pesquero, P.R.; Lang, E.A.S.; Samaan, M.; Araujo, R.C.; Pesquero, J.B.; Pesquero, J.L. (2011). Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from Bothrops leucurus (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. 03 julio 2021 de, ELVESIER Sitio web: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0041010111001802?token=EDC17364075263058DC6EF706EAC28B8006FC7AFBFC807E3F76FF1C4B74108ED7A391B5386C4C1E5C3454BA1DDBE2804&originRegion=us-east-1&originCreation=20210706222928>
- Huang, T.F.; Holt, J.C.; Lukasiewicz, H.; Niewiarowski, S. (1987). Trigramin: A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. 02 julio 2021, de JBC Sitio web: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)47710-1/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)47710-1/pdf)
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston EH (2007) Screening and detection of apoptosis. 10 julio 2021, de J Surg Res SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.034>

- J. Bischoff. (1995). Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. 10 septiembre 2021, de Trends in Cell biology Sitio Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0962892400889497>
- Janib, S.M.; Gustafson, J.A.; Minea, R.O.; Swenson, S.D.; Liu, S.; Pastuszka, M.K.; Lock, L.L.; Cui, H.; Markland, F.S.; Conti, P.S.; et al. (2014). Multimeric disintegrin protein polymer fusions that target tumor vasculature. 03 julio 2021 de, NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4098058/pdf/bm401622y.pdf>
- John J. Wiens, Carl R. Hutter, *et al.* (2012). Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. 05 julio 2021, de The Royal Society Sitio web: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsbl.2012.0703>
- Juárez, P., Bolás, G., de Rezende, F. F., Calvete, J. J., & Eble, J. A. (2010). Recombinant expression in human cells of active integrin alpha 1 beta 1-blocking RTS-disintegrin jerdostatin. 30 agosto 2021, de Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.013>
- Judah Folkman, M.D. (1995). Clinical applications of research on angiogenesis. 10 septiembre 2021, de: The New England Journal of Medicine Sitio Web: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199512283332608>
- Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H (1999) Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. 10 julio 2021, de Circulation SitioWeb: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.CIR.99.21.2757>
- Kateryna Kyrylkova, Sergiy Kyryachenko, Mark Leid, and Chrissa Kioussi. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. 20 julio 2021, de ResearchGate Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/224918451\\_Detection\\_of\\_apoptosis\\_by\\_TUNEL\\_assay](https://www.researchgate.net/publication/224918451_Detection_of_apoptosis_by_TUNEL_assay)
- Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC (2003) A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. 10 julio 2021, de Am J Physiol Cell Physiol SitioWeb: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00353.2002>
- Kim, S.I.; Kim, K.S.; Kim, H.S.; Kim, D.S.; Jang, Y.; Chung, K.H.; Park, Y.S. (2003). Inhibitory effect of the salmosin gene transferred by cationic liposomes on the progression of B16BL6 tumors. 03 julio 2021 de, AACR Sitio web: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/19/6458.full-text.pdf>
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. 30 septiembre 2021, de Blood, Sitio Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120776081?via%3Dihub>
- Kren, A., Baeriswyl, V., Lehembre, F., Wunderlin, C., Strittmatter, K., Antoniadis, H., Fässler, R., Cavallaro, U., & Christofori, G. (2007). Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. 30 agosto 2021 de, The EMBO journal, SitioWeb: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601738>
- Kuhn HG, Dickinson Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. 10 julio 2021, de J Neurosci SitioWeb: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/16/6/2027.full.pdf>
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C (2012) Detection of apoptosis by TUNEL assay. 10 julio 2021, de PubMed SitioWeb: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22566045/>
- L.A. Calderon, *et al.* (2014). Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. 27 marzo 2021, de Hindawi Sitio web: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/203639/>
- Labclinics. (2015). IDENTIFICANDO LAS ETAPAS DE LA APOPTOSIS. 10 octubre 2020, de Labclinics Sitio web: <https://www.labclinics.com/identifying-stages-apoptosis/>
- Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. 05 septiembre 2021, de Bio-protocol, Sitio Web: <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.374>
- Li X, Darzynkiewicz Z (1995) Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. 10 julio 2021, de ResearchGate, Sitio Web: [https://www.researchgate.net/publication/14645896\\_Labeling\\_DNA\\_strand\\_breaks\\_with\\_BrdUTP\\_Detection\\_of\\_apoptosis\\_and\\_cell\\_proliferation](https://www.researchgate.net/publication/14645896_Labeling_DNA_strand_breaks_with_BrdUTP_Detection_of_apoptosis_and_cell_proliferation)
- Lin, E.; Wang, Q.; Swenson, S.; Jadvar, H.; Groshen, S.; Ye, W.; Markland, F.S.; Pinski, J. (2010). The disintegrin contortrostatin in combination with docetaxel is a potent inhibitor of prostate cancer in vitro and in vivo. 02 julio 2021, de Wiley Online Library Sitio web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.21173>
- Liu, Lu-Lu, Zhang, Bin-Bin, Gao, Quan-Wen, Bing, Li, Sha, Huang, & Bin, Yao. (2019). Morphological Observation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under Matrigel Three-Dimensional Culture Conditions. 10 septiembre 2021, de International Journal of Morphology, SitioWeb: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000100054>

- Lucena, S., Sanchez, E. E., & Perez, J. C. (2011). Anti-metastatic activity of the recombinant disintegrin, r-mojastin 1, from the Mohave rattlesnake. 30 agosto 2021, de Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.014>
- Lucena, S.E.; Romo, K.; Suntravat, M.; Sánchez, E.E. (2013). Anti-angiogenic activities of two recombinant disintegrins derived from the Mohave and Prairie rattlesnakes. 03 julio 2021 de, NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270208/pdf/nihms542580.pdf>
- M Story, R Kodym. (1998). Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. 30 agosto 2021, de Frontiers in Bioscience-Landmark SitioWeb: <https://www.fbscience.com/Landmark/articles/pdf/LandmarkA281.pdf>
- M. Martínez . (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. 10 septiembre 2021, de IBUN Sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a16.pdf>
- M. Ospina Pérez y C. Muñeton Peña. (2011). Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. 10 octubre 2020, de ISSN: 0121-0793 Sitio web: <https://www.redalyc.org/pdf/1805/180522525006.pdf>
- MAGNETOSUR. (2020). Análisis de sangre, ¿qué es y por qué se solicita?. 05 octubre 2020, de MAGNETOSUR Sitio web: <https://magnetosur.com/analisis-de-sangre-que-es/>
- Marcinkiewicz, C., Weinreb, P. H., Calvete, J. J., Kisiel, D. G., Mousa, S. A., Tuszynski, G. P., & Lobb, R. R. (2003). Obtustatin: a potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin in vitro and angiogenesis in vivo. 30 agosto 2021, de Cancer Research SitioWeb: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/9/2020.full-text.pdf>
- Marcinkiewicz, C.; Weinreb, P.H.; Calvete, J.J.; Kisiel, D.G.; Mousa, S.A.; Tuszynski, G.P.; Lobb, R.R. (2003). Obtustatin: A potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin in vitro and angiogenesis in vivo. 02 julio 2021, de PubMed Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12727812/>
- Mary Ann McLane, *et al.* (2004). Desintegrins. 10 abril 2021, de University of Delaware Sitio web: [https://drive.google.com/drive/folders/1KqHC61Sw\\_8n5yFbxIxKkQmmKFtKtBsm](https://drive.google.com/drive/folders/1KqHC61Sw_8n5yFbxIxKkQmmKFtKtBsm)
- Matthew R. Ritter, Qing Zhou & Francis S. Markland. (2009). Contortrostatin, a Homodimeric Disintegrin, Actively Disrupts Focal Adhesion and Cytoskeletal Structure and Inhibits Cell Motility Through a Novel Mechanism. 02 julio 2021, de PubMed Sitio web: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/15419060109080708?needAccess=true>
- McDowell, S. B. 1987. Systematics. Pp. 3-50. In R. A. Seigel, J. T. Collins and S. S. Novak (eds), Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. Macmillan Publishing Company, New York.
- Minea, R.; Helchowski, C.; Rubino, B.; Brodmann, K.; Swenson, S.; Markland, F. (2012). Development of a chimeric recombinant disintegrin as a cost-effective anti-cancer agent with promising translational potential. 03 julio 2021 de, NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3130806/pdf/nihms281409.pdf>
- Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. Journal of global oncology, 3(6), 740–748. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>
- Momic, T.; Katzhendler, J.; Benny, O.; Lahiani, A.; Cohen, G.; Noy, E.; Senderowitz, H.; Eble, J.A.; Marcinkiewicz, C.; Lazarovici, P. (2024). Vimocin and Vidapin, cyclic KTS peptides, dual antagonists of  $\alpha1\beta1/\alpha2\beta1$  integrins with antiangiogenic activity. 02 julio 2021, de PubMed Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24939421/>
- Morris, V. L., Schmidt, E. E., Koop, S., MacDonald, I. C., Grattan, M., Khokha, R., McLane, M. A., Niewiarowski, S., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1995). Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. 30 agosto 2021, de Experimental cell research, SitioWeb: <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1266>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B. J., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. 05 octubre 2021, de Nature protocols, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853886/>
- N. Beltrán, C. González. (2016). TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS. 12 marzo 2020, de Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa Sitio web: <http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Técnicas de Cultivos Celulares e Ingenieria de Tejidos.pdf>
- National Cancer Institute. (-). Cell Culture. 12 marzo 2020, de National Cancer Institute Sitio web: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cell-culture>
- National Cancer Institute. (s.f). Types of Cancer Treatment. 12 junio 2021, de National Cancer Institute Sitio web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. 10 octubre 2021, de Trends in biochemical sciences, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9270303/>

- Olfá, K. Z., José, L., Salma, D., Amine, B., Najet, S. A., Nicolas, A., Maxime, L., Raoudha, Z., Kamel, M., Jacques, M., Jean-Marc, S., Mohamed, e., & Naziha, M. (2005). Lebestatin, a disintegrin from Macrovipera venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. 30 agosto 2021, de Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, SitioWeb: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700350>
- OMS. (2020). Cáncer. 01 octubre 2020, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
- OMS. (2021). Cáncer. 16 junio 2021, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Orend, G., & Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. 30 agosto 2021, de NIH SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.017>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. 05 octubre 2020, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). Perfiles de país sobre cáncer, 2020. 05 octubre 2020, de Organización Panamericana de la Salud Sitio web: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es)
- P. Majtnerová y T. Roušar. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. 10 julio 2021, de SpringerLink Sitio web: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-018-4258-9>
- Pozarowski, P., Grabarek, J., & Darzynkiewicz, Z. (2003). Flow cytometry of apoptosis. 05 octubre 2021, de Current protocols in cytometry, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18770781/>
- R Alexander Pyron, Frank T Burbrink and John J Wien. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. 04 julio 2021, de ResearchGate Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/236579503\\_Pyron\\_RA\\_Burbrink\\_FT\\_Wiens\\_JJ\\_A\\_phylogeny\\_and\\_revised\\_classification\\_of\\_Squamata\\_including\\_4161\\_species\\_of\\_lizards\\_and\\_snakes\\_BMC\\_Evol\\_Biol\\_13\\_93](https://www.researchgate.net/publication/236579503_Pyron_RA_Burbrink_FT_Wiens_JJ_A_phylogeny_and_revised_classification_of_Squamata_including_4161_species_of_lizards_and_snakes_BMC_Evol_Biol_13_93)
- R. Sosa, N. Brandan, J. Jeréz. (2012). Apoptosis. 20 septiembre 2021, de UNNE Sitio web: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>
- Ramos, O.H.P.; Kauskot, A.; Cominetti, M.R.; Bechyne, I.; Salla Pontes, C.L.; Chareyre, F.; Manent, J.; Vassy, R.; Giovannini, M.; Legrand, C.; et al. (2007). A novel  $\alpha\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. 03 julio 2021 de, PubMed Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17952617/>
- Reagan-Shaw S, Ahmad N (2005) Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. 10 julio 2021, de FASEB J SitioWeb: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.04-2910fje>
- Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, Cakar Z, De Geyter C, Agarwal A (2017) Inter- and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. 10 julio 2021, de Andrology SitioWeb: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/andr.12334>
- S. Perales Romero. (s.f). PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO ARTERIALES EN CULTIVO.. 07 octubre 2020, de Universidad de Granada Sitio web: <https://hera.ugr.es/tesisugr/15476856.pdf>
- S. Yang, M. Lu, C. Chien et al., (2005). "Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III," Life Sciences, vol. 76, no. 21, pp. 2513–2522. Sitio Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320505000469>
- Sánchez, E. E., Lucena, S. E., Reyes, S., Soto, J. G., Cantu, E., Lopez-Johnston, J. C., Guerrero, B., Salazar, A. M., Rodríguez-Acosta, A., Galán, J. A., Tao, W. A., & Pérez, J. C. (2010). Cloning, expression, and hemostatic activities of a disintegrin, r-mojastin 1, from the mohave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). 30 agosto 2021, de Thrombosis research, SitioWeb: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.06.006>
- Sanman, L. E., & Bogyo, M. (2014). Activity-based profiling of proteases. 10 octubre 2021, de Annual review of biochemistry, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24905783/>
- Scarborough, R. M., Rose, J. W., Hsu, M. A., Phillips, D. R., Fried, V. A., Campbell, A. M., Nannizzi, L., & Charo, I. F. (1991). Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. 18 octubre 2021, de The Journal of biological chemistry, Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2033037/>
- ScienCell. (-). TUNEL Apoptosis Assay. 20 julio 2021, de ScienCell Sitio web: <https://www.sciencellonline.com/PS/8088.pdf>
- Seoane, A. I., Tran, V. L., Sanchez, E. E., White, S. A., Choi, J. L., Gaytán, B., Chavez, N., Reyes, S. R., Ramos, C. J., Tran, L. H., Lucena, S. E., Sugarek, M., Perez, J. C., Mandal, S. A., Ghorab, S., Rodriguez-Acosta, A., Fung, B. K., & Soto, J. G. (2010). The mojastin mutant Moj-DM induces apoptosis of the human melanoma SK-Mel-

- 28, but not the mutant Moj-NN nor the non-mutated recombinant Moj-WN. 29 septiembre 2021, de Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2930814/>
- Serim, S., Haedke, U., & Verhelst, S. H. (2012). Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments. 10 octubre 2021 de, ChemMedChem, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22431376/>
- Shimokawa, K., Jia, L. G., Shannon, J. D., & Fox, J. W. (1998). Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. 29 septiembre 2021, de Archives of biochemistry and biophysics, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9637732/>
- Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2019). Acerca del cáncer de pulmón. 05 octubre 2020, de American Cancer Society Sitio web: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/9436.00.pdf>
- Staniszewska, I.; Walsh, E.M.; Rothman, V.L.; Gaathon, A.; Tuszyński, G.P.; Calvete, J.J.; Lazarovici, P.; Marcinkiewicz, C. (2009). Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen receptors-dependent melanoma. 02 julio 2021, de Pubmed Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502781/>
- Stephen P. Mackessy, *et al.* (2018). Venom Ontogeny in the Mexican Lance-Headed Rattlesnake (*Crotalus polystictus*). 27 marzo 2021, de MDPI Sitio web: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/7/271>
- Strömblad, S., & Cheresh, D. A. (1996). Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. 10 septiembre 2021, de Chemistry & biology, Sitio Web: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(96\)90176-3.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552196901763%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(96)90176-3.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552196901763%3Fshowall%3Dtrue)
- Su Yeon Lee, *et al.* (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. 20 marzo 2021, de Hindawi Sitio web: <https://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2018/3537471.pdf>
- Swenson, S.; Costa, F.; Minea, R.; Sherwin, R.P.; Ernst, W.; Fujii, G.; Yang, D.; Markland, F.S. (2004). Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. 03 julio 2021 de, AACR Sitio web: <https://mct.aacrjournals.org/content/3/4/499.full-text.pdf>
- T. Montalván, C. Alberto & O. García, A & D. González, I. & E. Mondaca, S. & M. Acosta, Angélica (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 40(4),35-46.[fecha de Consulta 8 de septiembre de 2020]. ISSN: 1870-0195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006>
- Tabchi, S., Kassouf, E., Florescu, M., Tehfe, M., & Blais, N. (2017). Factors influencing treatment selection and survival in advanced lung cancer. Current oncology (Toronto, Ont.), 24(2), e115–e122. <https://doi.org/10.3747/co.24.3355>
- Teklemariam, T., Seoane, A. I., Ramos, C. J., Sanchez, E. E., Lucena, S. E., Perez, J. C., Mandal, S. A., & Soto, J. G. (2011). Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells. 29 septiembre 2021, de Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073737/>
- ThermoFisher Scientific. (-). Introduction to Cell Culture. 13 marzo 2020, de ThermoFisher Scientific Sitio web: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- Townsend, T. M., Larson, A., Louis, E. and Macey, J. R. 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: The position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. Systematic Biology 53: 735-757. Sitio Web: [https://www.researchgate.net/publication/8182263\\_Molecular\\_Phylogenetics\\_of\\_Squamata\\_The\\_Position\\_of\\_Snakes\\_Amphisbaenians\\_and\\_Dibamids\\_and\\_the\\_Root\\_of\\_the\\_Squamate\\_Tree](https://www.researchgate.net/publication/8182263_Molecular_Phylogenetics_of_Squamata_The_Position_of_Snakes_Amphisbaenians_and_Dibamids_and_the_Root_of_the_Squamate_Tree)
- Victor David, Barbara Barbosa Succar, João Alfredo de Moraes, Roberta Ferreira Gomes Saldanha-Gama, Christina Barja-Fidalgo and Russolina Benedeta Zingali. (2018). Recombinant and Chimeric Disintegrins in Preclinical Research. 03 julio 2021, de NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116119/pdf/toxins-10-00321.pdf>
- Vyas, V. K., Brahmhatt, K., Bhatt, H., & Parmar, U. (2013). Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. 30 agosto 2021, de Asian Pacific journal of tropical biomedicine SitioWeb: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60042-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60042-8)
- W. D. DeWys, H. C. Kwaan, and S. Bathina, (1976). “Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy,” Cancer Research, vol. 36, no. 10, pp. 3584–3587. Sitio Web: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/36/10/3584.full-text.pdf>
- Wang Y, Huang G, Wang Z, Qin H, Mo B, Wang C (2018) Elongation factor-2 kinase acts downstream of p38 MAPK to regulate proliferation, apoptosis and autophagy in human lung fibroblasts. 10 julio 2021, de ELVESIER, Sitio

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0014482718300302?token=892A304BE012DF5A6DE197A2F9D83546CAC452DDA8DD48CC3002C6CB9467E141AB5F697D18A3677A6B79EACCA7CA5538&originRegion=us-east-1&originCreation=20210817175227>

- Watanabe, M., Hitomi, M., van der Wee, K., Rothenberg, F., Fisher, S. A., Zucker, R., Svoboda, K. K., Goldsmith, E. C., Heiskanen, K. M., & Nieminen, A. L. (2002). The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. 10 octubre 2021, de *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12533214/>
- Wiens, J. J., Brandley, M. C. and Reeder, T. W. (2006). Why does a trait evolve multiple times within a clade? Repeated evolution of snakelike body form in squamate reptiles. *Systematic Biology* 60: 123-141.
- Wong, M., Lao, X. Q., Ho, K. F., Goggins, W. B., & Tse, S. (2017). Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific reports*, 7(1), 14300. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14513-7>
- Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M (2012) Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. 10 julio 2021, de PubMed SitioWeb: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22429306/>
- Ye X, Lin JY, Lin ZB, Xue AM, Li LL, Zhao ZQ, Liu L, Shen YW, Cong B (2017) Axin1 up-regulated 1 accelerates stress- induced cardiomyocytes apoptosis through activating Wnt/beta- catenin signaling. 10 julio 2021, de ELVESIER, SitioWeb: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0014482717304482?token=8C44C4F0D0356CC5B85566442FA183922CE371415D7B69BB00E3F926EF40E4C968AEF2576BD451CEA77C40769F50171D&originRegion=us-east-1&originCreation=20210817175419>
- Zamay, T. N., Zamay, G. S., Kolovskaya, O. S., Zukov, R. A., Petrova, M. M., Gargaun, A., Berezovski, M. V., & Kichkailo, A. S. (2017). Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. 30 agosto 2021, de NCBI Sitio Web: <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>
- Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2001). Current concepts in cell death. 05 octubre 2021, de *Current protocols in cell biology*, Sitio Web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18228340/>
- Zhou, Q., Sherwin, R.P., Parrish, C. et al. (2000). Contortrostatin, a dimeric disintegrin from contortrix contortrix, inhibits breast cancer progression. 02 julio 2021, de SpringerLink Sitio Web: <https://doi.org/10.1023/A:1006457903545>