

DIVISIÓN DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de los Mecanismos de Muerte Celular
Activados por la Administración del Radiofármaco
Teranóstico ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 en un rango de
Dosis de 1-5Gy

ESTADIA DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

BENJAMIN ESTEBAN MARTINEZ VENTURA

Asesor Externo :

Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Asesor Interno:

Dr. Omar Alberto Hernández Aguirre



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO

Evaluación de los Mecanismos de Muerte Celular
Activados por la Administración del Radiofármaco
Teranóstico ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 en un rango de
Dosis de 1-5Gy

AGRADECIMIENTOS



Este trabajo se desarrolló en la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud (Departamento de Materiales Radiactivos) con el apoyo del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y por el Consejo Nacional Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto SEP-CB-2014-01-242443). Esta investigación se realizó como parte de las actividades del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, CONACyT. Bajo la dirección académica de la Dra. en C. Erika Patricia Azorín Vega y la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis primeramente a DIOS, quien me dio sabiduría e inteligencia; A mis padres Héctor, Martha y Gabriela que sin ellos no sería lo que soy y lo que tengo, así como su apoyo y amor para mí todo el tiempo.

A mi hermano Joshland que fue un motor vital al iniciar esta carrera.

A mis Tías Ligia y Claudia así como a mis primos Héctor, Leilany y Stephany por el apoyo, amor, cuidados y sustento día con día.

A mis amigos quienes me apoyaron y alentaron durante esta etapa de mi vida.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar ninguna circunstancia, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

A mis asesores de tesis la Dra. Erika Azorín y Dr. Omar Hernández quienes me enseñaron y corrigieron durante este proyecto.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

“Así es como la vida da un giro de 360 grados, te das cuenta que las cosas cambian. Que lo que pensabas ayer, hoy, es diferente, que todo lo que empezó debe terminar su ciclo. No sé si es madurar, no estoy seguro, pero de lo que estoy seguro es que es bueno volar, conocer tú máximo y tú mínimo, crecer mental, emocional y espiritualmente. Los cambios son buenos, siempre y cuando te hagan feliz ¡... Arriésgate, lucha por lo que quieres, confía en ti. Nadie dijo que sería fácil pero de qué sirve la vida sin obstáculos, sin tristezas, sin miedos. Vive cada momento bueno y malo al máximo, porque cada uno da una lección que más adelante será tu mayor fortaleza.” -Benny Ventura.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Erika Patricia Azorín Vega: no encontré la manera de agradecerle todo lo que me ayudó y enseñó, gracias por todo, sobre todo la paciencia y dedicación brindada, así como la confianza y gratas experiencias.

A la Dra. Guillermina Ferro Flores, por su asesoría, tiempo y por transmitirme más que solo su valioso conocimiento.

Al Dr. Omar Alberto Hernández Aguirre por el apoyo brindado al realizar este trabajo.

A los revisores de este trabajo, por sus atinados comentarios.

A mis compañeros del Laboratorio de Radiofármacos: Carolina P, Alejandro A, Julio B, Karen, Julián, Andrés, Héctor, Abraham, Alondra, Naye.

A mis familiares y amigos más cercanos por acompañarme a lo largo de este camino y por el apoyo incondicional.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

-Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMEN	-- 7 -
INTRODUCCION	-8-
JUSTIFICACION DEL PROYECTO	- 10 -10-
OBJETIVO GENERAL	- 11 -
OBJETIVOS ESPECIFICOS	- 11 -
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ	- 12 -
PROBLEMAS A RESOLVER	- 15 -
ALCANCES Y LIMITACIONES	- 17 -
BASE TEÓRICO- PRÁCTICAS UTILIZADAS	- 18 -
ACTIVIDADES REALIZADAS	- 36 -
PRODUCTOS DEL PROYECTO	- 38 -
CONCLUSIONES	- 42 -
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	- 43 -

RESUMEN

La radioinmunoterapia con anticuerpos antiCD20 incrementa significativamente la tasa de remisión de los pacientes con linfomas de células B que sobreexpresan el CD20. Los anticuerpos radiomarcados dirigidos a los antígenos de superficie permiten entregar dosis escaladas de radiación a blancos específicos limitando así la dosis al tejido sano. El antiCD20 produce la muerte de las células por dos vías principales; activando el sistema inmune para que destruya las células malignas e induciendo la activación de las vías de muerte celular. El ^{177}Lu es un emisor de partículas beta (max. 0.497 MeV) con alcance máximo en tejido blando de 0.7 mm y una vida media de 6.7 días. Diversos estudios clínicos han establecido una dosis máxima tolerada (45mCi/m^2) para el ^{177}Lu -DOTA-rituximab, a la cual se observa una respuesta clínica favorable sin toxicidad hematológica. Sin embargo, los mecanismos moleculares de acción por efecto sinérgico del anti-CD20 y el radionúclido no han sido estudiados. En este trabajo se evaluó; por citometría de flujo, la cinética de activación de los mecanismos de muerte celular inducida por el tratamiento con ^{177}Lu -DOTA-antiCD20 de células de linfoma no Hodgkin (Raji). La dosis de radiación absorbida entregada al núcleo de las células se calculó por simulación Monte Carlo, considerando la contribución de las emisiones beta del radiofármaco presente en la membrana celular y el medio circundante, así como del fuego cruzado. Con este trabajo se pone de manifiesto, que la aplicación de dosis de radiación de 1 a 5 Gy del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-antiCD20, son suficientes para inducir la muerte celular por apoptosis y el arresto del ciclo celular. La combinación de estos factores (entrega continua de radiación, activación de los mecanismos de reparación y aumento de la radiosensibilidad) provocan la activación aguda del programa apoptótico resultando en una muerte celular significativa después de 96h del tratamiento. El análisis temporal de la muerte celular sugiere la activación temprana de la apoptosis que se ve contrarrestada por la activación de los procesos de reparación ocasionados por una irradiación sostenida, lo cual conduce al arresto celular e incrementa la citotoxicidad, quedando así favorecida la activación repentina de la apoptosis después de varios días de tratamiento.

INTRODUCCION

Los radiofármacos teranósticos son vectores moleculares con reconocimiento específico que cumplen una función diagnóstica y terapéutica de forma simultánea. Además de incorporar funciones diagnósticas y terapéuticas, estas entidades pueden ser útiles en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a la terapia combinada (KINDERS, R... (2007). *Molecular interventions*. US: LIMUS.).

A través del uso de radiofármacos es posible registrar y detectar por imagen *in vivo*, la distribución espacio-temporal de procesos moleculares o celulares para aplicaciones diagnósticas y/o terapéuticas utilizando técnicas de medicina nuclear molecular. Mirando hacia el futuro en el campo de la radiofarmacia, estamos trabajando en el desarrollo de la próxima generación de radiofármacos que combinen una variedad de propiedades para la realización simultánea de múltiples funciones (Marchetti S. & Schellens J.H.M. . (2007). *The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials*. *British Journal of Cancer*. . US: BJC. & Kelloff G.J.. (2005). *The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development*.. US: *Clin. Cancer Res.*).

Dentro de los desarrollos tecnológicos de nuestro grupo de investigación indicados para el tratamiento de linfomas tipo no-Hodgkin se cuenta con el radiofármaco ^{188}Re -Anti-CD20 registrado ante COFEPRIS con el número 0613R2011 SSA y el radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 que se desarrolló recientemente como una formulación liofilizada la cual ha sido evaluada *in vitro* mostrando resultados muy favorables (Banerjee S.. (2015). *Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications*. US: *Chem. Rev.*). El renio-188 (^{188}Re) con un tiempo de vida media menor y una $E_{\text{máx}}$ mayor que la del lutecio-177 (^{177}Lu), es capaz de depositar una mayor cantidad de energía dentro de células tumorales en un periodo de tiempo relativamente corto; es decir, que su tasa de dosis absorbida es mayor lo cual es generalmente favorable desde el punto de vista biológico por la alta tasa proliferativa de células cancerosas, que puede darse cuatro veces o más en un solo día. No obstante, las partículas beta negativas del ^{177}Lu tienen un alcance en tejido ideal para neoplasias como los linfomas tipo no-Hodgkin cuyas células tumorales son relativamente pequeñas (11-12 micras). Ambos radionúclidos (^{188}Re y ^{177}Lu) poseen propiedades que los hacen buenos candidatos para su utilización en radioinmunoterapia y terapia radionuclídica de blancos moleculares, pero la disponibilidad de ^{188}Re , comparada con la del ^{177}Lu , es mucho menor. El ^{177}Lu se puede obtener indirectamente a partir de ^{176}Yb en un ciclotrón o por una ruta directa usando el ^{176}Lu como blanco en un reactor nuclear (Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. (2012). *Antibody therapy of cancer*. US: *Nature Reviews Cancer*), (Press, O. W. . (2003). *Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphomas: a historical perspective*..

US: *Semin. Oncol.*) La medicina nuclear cuenta con aplicaciones terapéuticas importantes y es ampliamente utilizada para la obtención de imágenes con las que a menudo se identifican anormalidades en etapas muy tempranas en la progresión de una enfermedad (Press, O. W. & Rasey, J. . (2000). *Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists.*. US: *Semin. Oncol.*)

Los radiofármacos de blancos moleculares presentan la ventaja de que la energía de radiación es depositada en forma altamente selectiva para eliminar a las células malignas. En particular, los radiofármacos de ¹⁷⁷Lu con reconocimiento molecular específico, se han propuesto como una nueva clase de radiofármaco teranóstico debido a las propiedades terapéuticas (emisión β- máxima de 497 keV) y diagnósticas (emisión-γ para imagen nuclear de 113 y 208 keV) del radionúclido (Wittrup, K. D., Thurber, G. M., Schmidt, M. M. & Rhoden, J. J. . (2012). *Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents.* US: *Methods Enzymol.*).

La radioinmunoterapia (RIT) emplea anticuerpos como portadores de radiactividad. Los anticuerpos radiomarcados son formulados como drogas estériles y libres de pirógenos que pueden administrarse vía intravenosa, intratumoral o vía peritoneal. Una vez inyectado, el radioanticuerpo se distribuye en el torrente sanguíneo y solo una fracción del anticuerpo (0.01-.0001%) se concentra en el tumor mientras el resto se localiza en sangre y tejidos sanos tales como hígado, bazo y riñones.

La RIT es aplicada frecuentemente a leucemias y linfomas ya que son un tipo de neoplasia altamente radiosensible que está confinada a una cavidad o espacio accesible de modo que se evita la dilución del anticuerpo radiomarcado; sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos cuantitativos para estimar la dosis de radiación absorbida tanto por el tejido sano como por el tumor con la intención de elegir un tratamiento personalizado que evite la toxicidad asociada con una sobreexposición a la radiación (Larson, S. M. (1992). *PET scanning of iodine-124-3F9 as an approach to tumor dosimetry during treatment planning for radioimmunotherapy in a child with neuroblastoma.*. US: *J. Nucl. Med.*). El antígeno CD20 es un blanco terapéutico muy efectivo para el tratamiento del cáncer de células B; CD20 es una fosfoproteína no glicosilada de 35KDa que se expresa en la superficie de casi todos los linfocitos B maduros y está presente en abundancia en el 95% de los linfomas de células B.

Cuando el daño al ADN producido por la dosis de radiación absorbida al núcleo depositada por la RIT está más allá de la capacidad de reparación de la célula tumoral, ésta entra en apoptosis o necrosis.

JUSTIFICACION DEL PROYECTO

El desarrollo de técnicas genéticas, bioquímicas e inmunológicas ha permitido un avance significativo en la identificación y comprensión de los procesos biológicos que ocurren en distintos tipos celulares e incluso dentro de células individuales. El empleo de estos métodos ha permitido clarificar muchos de los mecanismos que subyacen a la fisiopatología celular. El crecimiento celular es un balance entre proliferación y muerte celular, y una de las medidas más exactas de su variación neta es el incremento o la disminución del número de células presentes en el entorno de medición. La estimación del crecimiento celular mediante métodos convencionales de enumeración como la microscopía o los contadores automáticos de células es un método laborioso y sometido a limitaciones de precisión cuantitativa. Además, estos métodos analíticos no son adecuados para distinguir distintos tipos celulares de morfología parecida y, por tanto, de medir el crecimiento de poblaciones celulares específicas definidas en base a criterios moleculares de diferenciación celular (Lundberg A.S. and Weinberg R.A. . (1999). *Control of the cell cycle and apoptosis. US: Eur. J. Cancer.*).

En los últimos años, la identificación de la relevancia de la apoptosis en la biomedicina ha provocado un gran incremento en su investigación. Los métodos de citometría de flujo utilizados en el estudio de la apoptosis son de los más importantes para su cuantificación. Los métodos habitualmente empleados para el análisis de la apoptosis y viabilidad de preparaciones de células en suspensión permiten la determinación de la proporción de ambos estados. En este sentido, la disminución o desaparición de una población celular identificada por la expresión de antígenos de superficie en un cultivo puede explicarse por su fragmentación en cuerpos apoptóticos dejando, por tanto, de ser reconocibles como células. También, es posible que las células que han iniciado el proceso apoptótico de una determinada población pierdan la expresión del antígeno que sirve para identificarlas. Por estas razones, se propuso elaborar un protocolo óptimo que permita el análisis cuantitativo de la apoptosis de células en cultivo expuestas a radiofármacos teranósticos utilizando el citómetro de flujo (Evan G. & Littlewood T. (1998). *A matter of life and cell death. US: Science.*).

La radioinmunoterapia (RIT) es una opción para el tratamiento de tumores que combina mecanismos biológicos y radiolíticos con lo que se alcanza una remisión del linfoma mayor que la que se logra cuando se aplican únicamente anticuerpos (Witzig TE.. (2002). *radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non -Hodgkin's lymphoma. US: J Clin Oncol.*). El efecto terapéutico de la RIT se ha estudiado empleando rangos de dosis amplios sin que quede completamente clara la efectividad de dosis mínimas con las que se evitarían los efectos no deseados asociados como la toxicidad hematológica (Forrer, F.,. (2009). *177Lu-radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study. US: European.*). En cuanto a la dosis máxima tolerada se ha descrito. Por otro lado se ha demostrado que el lutecio induce muerte por apoptosis. Lo que nos lleva a estudiar cual será la dosis mínima de radiación requerida para inducir apoptosis y que tan indispensable es la presencia del anticuerpo.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar por citometría de flujo la activación de las vías apoptóticas temprana y tardía, así como el arresto celular, inducidas por el radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-antiCD20 en células de linfoma humano (Raji) en un intervalo de dosis de 1 a 5 Gy

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Validar el Método de Citometría de Flujo para medir Apoptosis.
- Discriminar los Mecanismos a través de los cuales se está induciendo la muerte de las Células Raji expuestas al Radiofármaco Teranóstico ^{177}Lu -DOTA-antiCD20.
- Proponer Estudios de Capacidad Clonogénica Celular.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

Dentro del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares existe un área que se dedica a la Investigación y Desarrollo de Radiofármacos cuyo objetivo es generar conocimiento y con ello tecnología radiofarmacéutica propia transferible a su planta de producción de radiofármacos para satisfacer las necesidades del sector salud a través del suministro de radiofármacos para uso en medicina nuclear. Estudiantes de diferentes carreras pueden incorporarse a los proyectos de investigación para desarrollar diversas actividades que los acerquen al quehacer científico como parte de su estancia.

Se participó en el proyecto interno de investigación que está enfocado en el análisis bioquímico de las respuestas celulares a los radiofármacos desarrollados en el área como parte de su caracterización biológica; en particular, con el tema de apoptosis temprana.

El laboratorio cuenta con el equipo necesario para la realización de este tipo de investigaciones; el laboratorio es un espacio adecuado para reproducir sistemáticamente la síntesis y caracterización química de los radiofármacos y las pruebas in vitro necesarias para el desarrollo experimental planteado para esta estancia. El laboratorio está provisto de diferentes áreas de trabajo debidamente delimitadas por su ubicación, señalización, equipamiento e instalaciones.

El laboratorio de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares cuenta con las siguientes áreas de trabajo:

- 3 anexos para guardar el material.
- 7 anexos para almacenar reactivos.
- 6 mesas de trabajo o áreas de experimentación.
- 1 mesa de trabajo principal, para el Asesor.
- 1 lavabo y/o tarja
- instalación hidráulica
- Instalación de gas
- Instalación eléctrica

Instalaciones.

- Hidráulicas: Esta instalación provee al laboratorio de agua potable, indispensable para la realización de los diferentes experimentos, así como para la limpieza del material, equipo y áreas de trabajo.
- Gas: Esta instalación es destinada a conducir el gas a las llaves colocadas en las mesas de trabajo.
- Eléctricas: Esta instalación provee de corriente eléctrica al laboratorio en áreas muy específicas.

Conocimiento del Reglamento del Laboratorio

Al trabajar dentro del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, se proporcionó un reglamento específico, la inducción de Seguridad Industrial y Protección Civil del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), tienen como objetivo facilitar a los Becarios, las medidas de prevención de manera general a las que deberán apegarse en el área donde realizaran sus actividades, dentro de las instalaciones del Instituto. El cual menciona las características que el personal debe cumplir para realizar dicho trabajo; a continuación se mencionan las características más importantes

- Orden y Limpieza.
- No jugar ni correr dentro del laboratorio.
- No ingerir líquidos, ni alimentos.
- Utilizar el equipo de protección personal adecuado para la actividad que se va a desarrollar.
- Las sustancias químicas deben estar bien identificadas y contar con su hoja de seguridad (HDS), que es donde se encuentra la información de los riesgos que presente y como controlar esa sustancia en caso de presentar fuga, derrame, etc.
- Cuando vaya a haber desprendimiento de vapores se deberá trabajar en la campana de extracción.

Colores de Seguridad y su significado:

- **Rojo:** prohibición. Paro. Material, equipo y sistemas para combate de incendio. Color contrastante: Blanco.
- **Amarillo:** advertencia de peligro. Delimitación de áreas. Advertencia de peligro por radiaciones ionizantes. Colores contrastantes: negro y magenta.

- **Verde:** condición segura.
- **Azul:** Señal de obligación. Comportamiento o acción específica. Obligación de utilizar equipo de seguridad.

Instrumentos de Laboratorio

A continuación se mencionan los instrumentos de laboratorio con los que se trabajó en el laboratorio:

- ❖ AGITADOR ELECTROMAGNETICO
- ❖ PIPETAS GRADUADAS
- ❖ BOTELLAS DE CULTIVO
- ❖ MICROPIPETAS
- ❖ MATRAZ ERLLENMEYER
- ❖ MATRAZ VOLUMETRICO
- ❖ VASO DE PRECIPITADO
- ❖ TUBOS FALCON
- ❖ CRIOTUBOS
- ❖ PISETAS
- ❖ GRADILLAS
- ❖ UNIDAD DE FILTRACIÓN

Equipos de Laboratorio

Los equipos con los que cuenta el laboratorio de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos y que se utilizaron durante el desarrollo de esta estancia son:

- ♣ POTENCIOMETRO
- ♣ PARRILLA CON AGITACIÓN
- ♣ CENTRIFUGA
- ♣ CAMPANA DE FLUJO LAMINAR
- ♣ CITOMETRO DE FLUJO (Muse)
- ♣ BOMBA DE VACIO
- ♣ PURIFICADOR DE AGUA
- ♣ BAÑO SECO
- ♣ BALANZA ANALITICA
- ♣ MICROSCOPIO ÓPTICO

PROBLEMAS A RESOLVER

Debido a la falta de información sobre el tema de apoptosis con la que cuento, en lo personal, fue necesario reunir material de diversas fuentes, primordialmente de artículos, para así poder disponer de la información necesaria al tratar de desarrollar un proyecto de esta naturaleza.

Obtener experiencia y conocimiento dentro del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos.

Dentro de lo laboral y experimental, se tuvieron ciertos problemas potenciales con su sugerencia experimental para resolverlo, a continuación se mencionan los siguientes:

Control positivo.- Debido a que el fenómeno a evaluar es la apoptosis temprana, se buscaron métodos para inducirlo de forma artificial. En la bibliografía se encontró que esto se logra de manera eficiente con estaurosporina; sin embargo, por cuestiones de bioseguridad este reactivo no se pudo adquirir de modo que se utilizaron métodos alternativos. Para determinar la inducción de apoptosis se realizó un curso temporal induciendo apoptosis con diferentes agentes (privación de nutrientes, cloro, peróxido de hidrogeno, calor, radiación UV) variando el tiempo de exposición a dichos agentes y encontramos que algunos tipos celulares no pudieron ser totalmente inducidos a la apoptosis. Sin embargo, el uso de cloro durante 24h permitió confirmar la presencia de células en apoptosis y con ello definir correctamente los parámetros de medición.

Bajo nivel de tinción.- A pesar de que el procedimiento de ensayo ha sido optimizado para funcionar utilizando varios tipos de células, cada línea celular se comporta de manera diferente. Los niveles de tinción con Anexina V son distintos en cada línea celular por lo que se probaron diferentes protocolos de tinción variando la cantidad de Anexina V a adicionar por número de células y el tiempo de incubación. La translocación de la Fosfatidilserina a la superficie celular es un evento temprano en la apoptosis, que puede preceder a la fragmentación del ADN por varias horas, y se puede invertir en algunos casos. Los resultados de la tinción con Anexina V pueden variar con el tiempo a medida que la apoptosis progresa.

La mala separación de poblaciones vivas y apoptóticas.- La baja tinción da como resultado una pobre separación de las poblaciones y esto no permite definir correctamente el grupo de células vivas de las muertas. Una vez optimizada la tinción (concentración de Anexina V y tiempo de incubación)

resultó más sencilla y confiable la selección de la ventana umbral (población a analizar) considerando que hay un $12\% \pm 3$ de células en apoptosis en condiciones control (sin tratamiento).

La variabilidad en los experimentos del día a día.- Antes de hacer las mediciones es importante como parte del protocolo de medición hacer lavados constantes del capilar y las líneas del equipo así como calificar el conteo de partículas fluorescentes utilizando una suspensión de referencia. Si después de seguir con el procedimiento anterior, los resultados eran inconsistentes se decidió contemplar dentro del procedimiento la homogenización de la muestra antes de la adquisición; para lograrlo y evitar diferencias en la agitación de las muestras, se empleó un mezclador para tubos con lo que se garantizó que se tenía una suspensión celular homogénea.

Se tomó la precaución de monitorear los cultivos celulares experimentales diariamente y de manera simultánea al muestreo para asegurar que la viabilidad celular y el número de células que se analiza son consistentes ya que cualquier caída en el número de células o viabilidad puede influir en los resultados experimentales.

ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances:

El presente trabajo exploró el rendimiento, eficiencia y eficacia del citómetro de flujo llamado Muse el cual hace un análisis sofisticado basado en la fluorescencia de células únicas marcadas con Anexina V acoplada a un fluorocromo para evaluar apoptosis temprana. El sistema Muse, es rápido, fácil de utilizar, conveniente y la preparación de la muestra es mínima a comparación de otros citómetros de flujo, después de cargar las muestras en el sistema Muse, cuenta con un software que proporciona un análisis detallado o un resumen de la muestra analizada en cuestión de minutos. Se reforzó el manejo de micropipetas y pipetas, se aprendió el cultivo in vitro de líneas celulares en medios acuosos, se aprendió a preparar las muestras, con sus respectivos protocolos para obtener una buena lectura de ellas.

Limitaciones:

Dentro de las limitaciones en el presente proyecto se mencionan las siguientes:

Los resultados del ensayo son dependientes de manejo adecuado de las muestras, los reactivos utilizados y por lo tanto los instrumentos. También los tipos de células varían en el contenido de fosfatidilserina en su membrana celular, por lo tanto la cantidad de fosfatidilserina expuesta en la superficie celular varía entre los tipos de células después que la apoptosis ha sido inducida.

BASE TEÓRICO- PRÁCTICAS UTILIZADAS

❖ RADIOACTIVIDAD:

Definición de radiactividad:

La radiactividad es la emisión de partículas o radiación electromagnética de núcleos de átomos inestables.[9]

El criterio de estabilidad más probable es la relación neutrón-a-protón (N/Z) en el núcleo del átomo. El decaimiento radioactivo por emisión de partículas o captura de electrones cambian el número atómico del radionúclido, mientras el decaimiento por emisión de rayos- γ no lo hace.

Decaimiento radiactivo

El decaimiento radiactivo puede ser por alguno de los siguientes seis procesos:

- I. Fisión espontánea: es el proceso en el cual un núcleo pesado se rompe en fragmentos en la proporción 60:40. este proceso es acompañado por la emisión de 2 o 3 neutrones con una energía promedio de 1.5MeV. esta fisión ocurre espontáneamente o por bombardeo con partículas energéticas. La probabilidad de fisión espontánea aumenta con el peso del núcleo.
- II. Decaimiento alfa (α): los núcleos pesados también tienen decaimiento por partículas α , la cual es un ion de helio con dos protones y 2 neutrones. El número atómico del núclido padre es por lo tanto disminuido en 2 y el número de masa en 4. Las partículas α son monoenergéticas y su alcance en materia es muy corto, de 1 – 10 cm en el aire y hasta 0.1 mm en tejido, con una energía aproximada de 0 – 4 MeV.
- III. Decaimiento beta (β^-): cuando un núcleo es “rico en neutrones” emite partículas β^- junto con un antineutrino. Un antineutrino es una entidad con poca masa. Un neutrón decae a protón, partícula β^- y antineutrino. La energía emitida por las partículas β^- es de 0 – 7 MeV, su alcance en el aire es de 0 – 10 m y en el tejido de 0 – 2 cm. El decaimiento β^- puede ser seguido de una emisión de rayos- γ emitidos dependiendo de la energía de excitación Después del decaimiento β^- el número atómico del núclido hijo es uno mas que de el núclido padre, pero el número de masa es igual para ambos. Los electrones que pasan a través de la materia son desacelerados en el campo Coulombico del núcleo de los átomos y como resultado de la pérdida de electrones se generan los rayos X los cuales son usados para producir radiografías.
- IV. Decaimiento positron o β^+ : ocurre en núcleos que son “deficientes en neutrones” o “ricos en protones” que emiten una partícula β^+

acompañada de un neutrino. Después de la emisión de partículas β^+ el núclido hijo tiene un número atómico menor en 1 que el del padre. El alcance de positrones es corto en la materia. Al final el positron se combina con un electrón y ambos se aniquilan dando origen a 2 fotones 511 keV que son emitidos en direcciones opuestas. Entonces, en el decaimiento β^+ , un protón se transforma en un neutrón + positrón + neutrino. La emisión de positrones tiene lugar solo cuando la diferencia de energía entre el núclido padre e hijo es igual o mas grande que 1.02 MeV.

- V. Captura de electrón (EC): Cuando un núcleo tiene una pequeña proporción N/Z comparada con los núcleos estables, es alternativo a la emisión de positrones.

En este tipo de decaimiento un electrón es capturado desde una capa de electrones extranuclear. De esta manera se transforma un protón a un neutrón y se emite un neutrino. Para que este proceso ocurra, la diferencia de energía ente el padre y el hijo es menor a 1.02 MeV. El número atómico del padre es reducido en 1 en este proceso. Generalmente, los electrones capturados son los de la capa K debido a su proximidad al núcleo. La diferencia de energía de las capas de electrones aparecerán como un rayo X que es característico del núcleo hijo.

- VI. Transición Isomérica (IT): un núcleo puede permanecer en varios estados energéticos excitados y estos estados son referidos como “estados isoméricos” y decaen al estado basal con un tiempo de vida de pico segundos hasta años. El decaimiento de un estado de mayor excitación a uno de menor excitación es llamado transición isomérica. En este tipo de decaimiento la diferencia en los estados de energía puede aparecer como rayos- γ □ Cuando el estado isomérico es de larga vida puede ser llamado “estado metaestable” y puede ser medido con instrumentos apropiados (10).

Daño celular producido por radiaciones ionizantes

La radiación ionizante directa consta de partículas cargadas que interactúan con la materia sobre todo mediante la fuerza de Coulomb, que les hace repeler o atraer electrones de átomos y moléculas en función de sus cargas. Este fenómeno puede producir una alteración del funcionamiento normal de la célula y si la cantidad de energía emitida es suficiente, la destrucción celular y la necrosis de los tejidos. Esto se conoce muy bien gracias a la radioterapia cuya base consiste precisamente en el empleo de la destrucción celular para combatir las neoplasias malignas, por lo general más radiosensibles que los tejidos normales (11). Cuando la radiación ionizante incide sobre un organismo vivo, la interacción a nivel celular se puede llevar a cabo en las membranas, el citoplasma y el núcleo.

Si la interacción sucede en alguna de las membranas se producen alteraciones de permeabilidad, lo que hace que puedan intercambiar fluidos en cantidades mayores que las normales. En ambos casos la célula no muere, pero sus funciones de multiplicación no se llevan a cabo. En el caso en que el daño es generalizado la célula puede morir.

En el caso en que la interacción sucede en el citoplasma, cuya principal sustancia es el agua, al ser ésta ionizada se forman radicales químicamente inestables. Algunos de estos radicales tenderán a unirse para formar moléculas de agua y moléculas de hidrógeno (H), las cuales no son nocivas para el citoplasma. Otros se combinan para formar peróxido de hidrógeno, el cual sí produce alteraciones en el funcionamiento de las células. La situación más crítica se presenta cuando se forma el hidronio, el cual produce envenenamiento. Cuando la radiación ionizante llega hasta el núcleo de la célula, puede producir alteraciones de los genes e inclusive rompimiento de los cromosomas, provocando que cuando la célula se divida lo haga con características diferentes a la célula original y si se lleva a cabo en una célula germinal (espermatozoide u óvulo) podrá manifestarse en individuos de futuras generaciones. Así, un cambio en la estructura del DNA podría transformar la célula normal en maligna (teoría mutacional de la carcinogénesis) (12).

❖ **RADIOFÁRMACOS**

Un radiofármaco es toda sustancia conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede administrarse en los seres humanos con fines diagnósticos y/o terapéuticos (10).

Aspectos generales de los radiofármacos

Los radiofármacos están formados por una sustancia que actúa como vehículos y un isótopo radiactivo. La sustancia aporta al radiofármaco la característica de dirigirse al órgano o tejido concreto, por lo cual presenta una actividad selectiva. Por lo tanto no posee actividad farmacodinámica pero si propiedades farmacocinéticas. La gran mayoría de los radiofármacos se usan como diagnóstico y solo unos pocos con fines terapéuticos.

Algunas diferencias con los medicamentos convencionales son que generalmente se administran en dosis única, se usan generalmente en cantidad de trazas, principalmente se administran por vía intravenosa, carecen de efectos farmacodinámicos (no existe una relación dosis-efecto), su vida media efectiva es relativamente corta y que su composición varía con relativa rapidez como consecuencia de su desintegración radiactiva (19).

Características del radiofármaco ideal

El radiofármaco debe obtenerse con facilidad, ser económico y poder estar disponible en cualquier servicio de medicina nuclear; su vida media efectiva deberá ser corta: no superior al tiempo requerido para efectuar el estudio evitando así una irradiación al paciente mayor a la estrictamente necesaria; debe presentar selectividad adecuada por el órgano Diana: el fármaco debe localizarse en el órgano

deseado, debiendo ser la captación en los tejidos circundantes lo mas baja posible; inercia metabólica: no debe ser metabolizado *in vivo* antes de su localización en el órgano diana puesto que esto podría ocasionar una baja eficacia; idealmente debe presentar una dosis absorbida alta en el órgano diana cuando se quiera conseguir un efecto terapéutico y una dosis efectiva baja tanto en su aplicación terapéutica como diagnóstica. En definitiva debe poseer características que aporten una máxima eficiencia en el diagnóstico o tratamiento y una dosis de radiación mínima al paciente (20).

Síntesis de radiofármacos

Para sintetizar un nuevo radiofármaco hay que tener en cuenta factores como la compatibilidad química y estequiometría, es decir tener en cuenta la compatibilidad del radionúclido con la molécula que va a ser marcada y deben conocerse las proporciones óptimas de cada componente. Su carga, junto a los grupos químicos presentes, determina la solubilidad del compuesto, mientras que las moléculas que tienen una gran carga presentan una elevada solubilidad en soluciones acuosas, las no cargadas y por tanto menos polares serán más solubles en soluciones orgánicas, debe ser estable en solución acuosa y compatible con el pH sanguíneo, cuanto más liposoluble es un radiofármaco mayor es su unión a las proteínas plasmáticas y con más facilidad difunde a través de las membranas celulares, su tamaño es un factor determinante en su distribución dentro del sistema biológico. El radiofármaco debe ser estable tanto *in vivo* como *in vitro*, y factores como la luz, temperatura y pH condicionan su estabilidad. La biodistribución es esencial para establecer la eficacia y el uso del radiofármaco, incluye la unión a proteínas plasmáticas, la distribución en los tejidos, y factores de eliminación como el aclaramiento plasmático y la excreción del radiofármaco (21,22).

Control de calidad de los radiofármacos

Su objetivo es asegurar la identidad, pureza, seguridad biológica y eficacia del preparado antes de su administración. Dentro del control biológico se consideran la esterilidad y los pirógenos; el control físico-químico tiene un control organoléptico, en el tamaño, número de partículas, pH y pureza radioquímica; los controles radiactivos incluyen determinación de la pureza radionucleídica y determinación de la pureza radioquímica. La primera se determina como el porcentaje de radiactividad presente en el radiofármaco que se encuentra en la forma del radionúclido deseado, se establece con el espectro radiactivo del radiofármaco, en la práctica se exige una pureza superior a 90% para ser administrado al paciente. Para la determinación de la pureza radioquímica se usan métodos de cromatografía en papel y/o capa fina, usándose el mejor sistema entre la adherencia del producto al soporte y su solubilidad en el solvente, una mala pureza radioquímica conlleva la obtención de una distribución diferente que repercute en la eficacia (23,24).

Distribución y eliminación de los radiofármacos

Después de la absorción o inyección intravenosa se distribuye y elimina del organismo de forma similar al de cualquier fármaco. Dependiendo de factores fisiológicos (flujo sanguíneo) y de las propiedades físico-químicas del radiofármaco (liposolubilidad, unión a proteínas plasmáticas, etc.). Pueden eliminarse inalterados o después de sufrir un proceso de biotransformación.

Se unen en distintos grados a las proteínas plasmáticas principalmente a la albúmina, en estas uniones influyen factores debidas al radiofármaco como la carga y su pH; y factores de las proteínas como su naturaleza y la concentración de aniones en el plasma. Los grupos carboxilos, aminos e hidroxilos de las proteínas determinan el alcance y la fuerza de unión con el radiofármaco lo que afecta la distribución y el aclaramiento plasmático así como su captación por el órgano diana. (25,26)

La velocidad de localización del radiofármaco en un órgano esta relacionado con la velocidad de depuración sanguínea después de la administración. La depuración sanguínea o plasmática puede ser determinada por la recolección sérica a diferentes intervalos de tiempo después de la inyección, y se mide la actividad plasmática. De un gráfico de actividad vs tiempo se puede determinar el tiempo de vida media en el plasma. La eliminación urinaria y fecal es importante en la evaluación clínica del fármaco, estos valores pueden ser determinados por recolección de orina o heces a diferentes tiempos después de la inyección y medir su actividad (10).

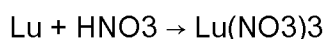
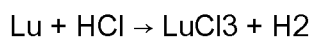
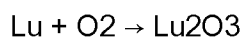
❖ QUÍMICA DEL LUTECIO

Historia

El lutecio fue descubierto en 1907 de forma independiente por el científico francés Georges Urbain, el mineralogista austríaco Carl Auer von Welsbach y por el químico americano Charles James, en el óxido de iterbio (iterbia). Su nombre, que procede del nombre romano de la ciudad de París, *Lutetia Parisiorum*, se debe a Urbain ya que el elemento fue llamado casiopeo por von Welsbach [27].

Propiedades químicas

Reacciona lentamente con el aire, el agua y también con los ácidos. Forma sales incoloras insolubles como fluoruros, carbonatos y fosfatos en las que actúa con valencia +3.



Abundancia

Se encuentra en la naturaleza con la mayoría del resto de las tierras raras, pero nunca en solitario de forma nativa. Es el menos abundante de todos los elementos presentes en la naturaleza al constituir el 8×10^{-5} % en peso de la corteza, por lo que figura en el lugar 59 en orden de abundancia de los elementos en la corteza terrestre [28].

Obtención

La monacita $[\text{CePO}_4]$ lo contiene en un 0.003 % y es su fuente comercial. También se encuentra en minerales de otras tierras raras: bastnaesita, policrasa o euxenita $[(\text{Y}, \text{Ce}, \text{Er}, \text{U}, \text{Th}, \text{Ca} \dots)(\text{Nb}, \text{Ta}, \text{Ti}, \text{Fe})_2\text{O}_6]$ y blomstrandina (igual que la euxenita, pero con mayor contenido en Ti), gadolinita $(\text{Y}_2\text{FeBe}_2[\text{SiO}_4]_2\text{O}_2)$, xenotima (YPO_4) , etc.

Producción

Este metal se ha obtenido puro hace pocos años (1950). Puede purificarse por reducción de LuCl_3 o LuF_3 anhidros con un metal alcalino o alcalinotérreo.

Aplicaciones

Se ha empleado para la fabricación de dentaduras postizas. Los núclidos estables (^{175}Lu y ^{176}Lu) que emiten radiación beta después de su activación con neutrones térmicos pueden usarse como catalizadores en craqueo, alquilación, hidrogenación y polimerización; encuentra también aplicaciones como captador de impurezas en la industria metalúrgica [29, 30].

Lutecio-177

El ^{177}Lu es un candidato ideal para el radiomarcado de fármacos y tiene características favorables para ser empleado en terapia radionuclídica usando péptidos y anticuerpos monoclonales.

Características físicas

- a) Su período de semi-desintegración es de 6.71 días, lo cual permite la organización de un sistema de distribución apto para servicios de Medicina Nuclear alejados de los centros de producción mundial [31].
- b) Tiene emisiones beta negativas con una energía máxima de 497 keV (abundancia 78 %) y una energía beta negativa promedio de 0.134 MeV con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando, por lo que puede ser utilizado para el tratamiento de micrometástasis y tumores de tamaño pequeño, dada su más eficiente deposición de energía. Además posee el efecto de fuego cruzado que permite la irradiación del tejido tumoral en forma homogénea, incluso en regiones donde el radiofármaco terapéutico no se acumula.
- c) Emite un fotón gamma de 208 keV (11 % de abundancia) apropiado para la adquisición de imágenes *in vivo* en equipos de SPECT y para la realización de estudios dosimétricos personalizados previos a la terapia radionuclídica que permiten establecer la dosis máxima tolerable para un determinado radiofármaco de ^{177}Lu a partir de las imágenes del paciente.

Características químicas

- a) La actividad específica del radionúclido es un factor crucial para su potencial aplicación clínica. En la actualidad el ^{177}Lu se comercializa con valores de 20 Ci/mg o 45 Ci/mg dependiendo del método de producción.
- b) En cuanto a la pureza radionuclídica, es de destacar que los niveles de ^{177}Lu (principal impureza de uno de los métodos de producción) son del orden de 95 ppm.
- c) Respecto a la contaminación metálica de trazas determinadas por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), los productos comerciales tienen menos de 20 μg de Fe/Ci de ^{177}Lu . Esta impureza es la más problemática, ya que interfiere significativamente disminuyendo los rendimientos de marcado.
- d) Métodos de producción. El ^{177}Lu puede obtenerse por la reacción de captura neutrónica (n,γ) a partir de la irradiación con neutrones térmicos en un reactor, de un blanco natural o enriquecido de $^{176}\text{LuO}_3$ o por la irradiación de un blanco de ^{176}Yb y la posterior separación electroquímica del ^{177}Lu

del blanco de Yb. La producción de ^{177}Lu por el primer método también posee algunas ventajas comparativas respecto de otros radionúclidos como el no ser necesario ningún tipo de purificación del radionúclido producido [32].

Radiotoxicidad

Es considerado como un radionúclido de radiotoxicidad moderada [33].

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Definición de anticuerpo

Los anticuerpos son glicoproteínas especializadas que han sido generadas in vivo en respuesta a estímulos moleculares particulares, conocidos como antígenos.

Estructura del anticuerpo

Están conformados por cuatro cadenas proteicas: dos pesadas y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuro. Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab y una fracción cristalizable (FC), la cual media funciones efectoras como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Las regiones Fab están, a su vez, conformadas por una región variable y otra constante. La región variable tiene una diversidad casi infinita para el reconocimiento de antígenos gracias a la Región Determinante de Complementariedad (CDR). La región constante, por su parte, ayuda en la estabilización de la reacción entre los segmentos CDR y el antígeno [34].

Mecanismos de acción del anticuerpo

Anticuerpos “fríos” son capaces de matar células tumorales a través de varios mecanismos tales como:

- *Vías de señalización apoptóticas
- *Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
- *Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC involucra la unión de C1 a la porción Fc del anticuerpo, resultando en la activación de la cascada, llevando a lisis celular. Por otra parte, en la ADCC participan los macrófagos, granulocitos y NK, los cuales liberan moléculas efectoras como perforina. Estas células se unen a los anticuerpos a través de sus receptores Fc gamma. Las células lisadas resultantes son después engullidas por células dendríticas y presentadas a células T citotóxicas. Anticuerpos monoclonales anti-CD20 están clasificados en dos grupos: tipo I y tipo II, los cuales difieren principalmente en sus funciones inmunes. Los anticuerpos de tipo I actúan principalmente a través de CDC, mientras que los de tipo II actúan por medio de ADCC [35].

Anti-CD20 (rituximab)

El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (murino/humano) utilizado en el tratamiento de varias enfermedades en las que hay expresión del antígeno CD20,[36]

LINFOMA NO-HODGKIN

Definición

Los linfomas no-Hodgkin son un grupo diverso y heterogéneo de desórdenes linfoproliferativos relacionados con linfocitos B, T o NK. Cada variedad histológica de linfoma no Hodgkin se caracteriza por la transformación maligna de las células linfoides, con morfología, inmunofenotipo, genética y clínica diferente [37].

Clasificación y epidemiología de LNH

En el LNH las neoplasias que se originan de las células B representan el 85% de los casos y el 15% restante corresponde a neoplasias de las células T y NK. Dentro de las neoplasias de las células B, los dos tipos más frecuentes son el linfoma difuso de células grandes que corresponde del 30-58% de los casos y el linfoma folicular con aproximadamente 22%.

Los LNH se dividen en agresivos e indolentes. De los agresivos el linfoma difuso de células grandes tipo B es el más frecuente, correspondiendo a aproximadamente 50%. De los tipos indolentes, el más común es el linfoma folicular. Tiene una incidencia de 24,000 nuevos casos al año [38].

Tratamiento de LNH

Rituximab ha cambiado significativamente el manejo de linfoma folicular, sin embargo, como primer tratamiento que es mantenido a lo largo de 2 a 3 años, lleva a enfermedad refractaria a anticuerpos anti-CD20, por lo cual la terapia estándar para ello es radioinmunoterapia, ya que los linfomas son tumores muy radiosensibles. Esta modalidad es poco empleada y debería ser considerada, debido a resultados favorables y baja morbilidad. Además, la eficacia anti-tumor de rituximab como administración única para linfomas de células B CD20-positivas es reportado ser de 33-64%, y es considerado ser insuficiente para el tratamiento exitoso de la enfermedad, por lo cual terapia combinada como radioinmunoterapia es altamente recomendada [39]

MUERTE CELULAR

La evolución ha dotado a los organismos pluricelulares de complejos y precisos mecanismos de control que permiten la regulación de procesos tan importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular, gracias a los cuales los seres vivos pueden mantener el equilibrio celular interno del organismo u homeostasis de los tejidos. Durante el proceso evolutivo se han desarrollado mecanismos para la eliminación de células anormales, peligrosas u originadas en exceso, para evitar el efecto perjudicial que éstas pudieran producir en el resto del individuo. Estos mecanismos participan en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, morfogénesis, remodelación tisular o respuesta inmune.

La idea de la existencia de un proceso de muerte celular de origen fisiológico o patológico fue desarrollada hace más de 160 años por Vogt (1842). Sin embargo, hubo que esperar muchos años para la aparición del término “muerte celular

programada”, originado por Lockshin (1964), que hacía referencia a la muerte sufrida por ciertas células del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Estos investigadores observaron que algunas células de éste gusano estaban programadas para morir. En 1972, Kerr, Willie y Currie propusieron la clasificación de los procesos de muerte en dos amplias categorías. El término de necrosis, que por entonces englobaba todas las formas de muerte, pasó a denominar un tipo de muerte rápida y violenta observada tras una alteración ambiental severa. En contraposición, aparecía el término de origen griego apoptosis, que significa la caída de la hoja, y que englobaba un proceso de muerte más controlado que desempeñaría una función complementaria a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares. Actualmente se sabe que tanto la apoptosis como la necrosis se producen en los organismos desde la fase embrionaria hasta la senescencia del organismo adulto.

La apoptosis se define como un proceso de suicidio celular, genéticamente controlado, caracterizado por la síntesis de nuevas macromoléculas en algunos casos, una gran demanda energética, y unas características morfológicas y bioquímicas fácilmente distinguibles. Este proceso de muerte puede originarse fisiológicamente, como en el desarrollo y la homeostasis de linfocitos (Rathmell y Thompson, 2002), o como respuesta a situaciones traumáticas tales como exposiciones a drogas antitumorales (Hickman, 1992; Troyano y col., 2001), metales pesados (Galan y col., 2000; Miguel y col., 2005), hipertermia, sustancias oxidantes, infecciones virales, etc. Alteraciones en el desarrollo de la apoptosis son la causa de un gran número de patologías humanas de extrema gravedad como cáncer, enfermedades autoinmunes, Alzheimer, Parkinson, SIDA, etc...(Barr y Tomei, 1994; Cotman y Anderson, 1995; Thompson, 1995; Hanahan y Weinberg, 2000). Tanto los mecanismos de regulación como los rasgos morfológicos y bioquímicos observados durante la ejecución del proceso de apoptosis están altamente conservados a lo largo de la evolución, por ello, la apoptosis observada en el gusano *C.elegans* es muy similar a la sufrida por células de mamífero (Mlejnek y Prochazka, 2002). En contraposición a la apoptosis, a la necrosis se le consideró un proceso pasivo y no fisiológico originado por un daño celular severo, en la mayoría de las ocasiones más importantes que el inductor de apoptosis. Posteriormente se ha demostrado que ambos tipos de muerte pueden coexistir en un mismo tejido (Ledda-Columbano y col., 1991). Los desencadenantes típicos de la necrosis son traumatismos químicos o físicos severos (Wyllie, 1987) que aunque inicialmente se describieron como procesos puramente pasivos, periódicamente aparecen artículos que muestran la existencia de mecanismos de regulación comunes a los observados en apoptosis, como por ejemplo la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Lemasters y col., 1999) o la oxidación celular (Hampton y Orrenius, 1997). Además tanto la apoptosis como la necrosis pueden ser inducidas por el mismo estímulo en una misma línea celular, dependiendo de las circunstancias experimentales (Eguchi y col., 1997; Guenal y col., 1997; Zhan y col., 1999).

Apoptosis

Independientemente del agente inductor que desencadene el proceso de apoptosis, las células que sufren este tipo de muerte comparten una serie de características propias fácilmente distinguibles. La función principal de la apoptosis es la

eliminación selectiva de una célula, evitando, a toda costa, el daño a las células adyacentes. Por este motivo, una de las características más importantes de la apoptosis es el mantenimiento íntegro de la funcionalidad de membrana plasmática que evita la salida del contenido intracelular al exterior. En los cultivos celulares *in vitro*, debido a la falta de células con capacidad fagocítica que eliminen los residuos celulares originados durante este tipo de muerte, las células apoptóticas pueden presentar en las últimas fases de este proceso daños en su membrana plasmática del mismo modo que las células que han sufrido necrosis, lo que se denomina necrosis secundaria, para diferenciarla de la necrosis genuina denominada necrosis primaria. La membrana de una célula apoptótica, además sufre la aparición de una serie de ondulaciones en su superficie que en inglés se denomina *blebbing*. Otra característica típica del proceso apoptótico es la condensación citoplasmática observada, fruto de la pérdida de iones K⁺, Cl⁻, e iones inorgánicos. La pérdida de estos iones va acompañada de la pérdida de agua que origina la disminución del volumen celular (Maeno y col., 2000). Además, este proceso se acompaña de una serie de alteraciones bioquímicas como es el cambio en la localización de ciertos fosfolípidos de la membrana plasmática, en concreto la externalización de fosfatidil serina. Este fosfolípido, originalmente enclavado en la cara interna de la membrana plasmática, tras su translocación, marcará a los macrófagos la existencia de cuerpos apoptóticos (descritos a continuación) que, junto con la reducción del volumen anteriormente comentado, facilitará la retirada por fagocitosis de las células muertas por apoptosis (Fadok y col., 1992).

Otro rasgo distintivo de la apoptosis es la condensación y posterior fragmentación internucleosomal del ADN observada en el proceso de muerte, que como principal efecto originará la incapacidad celular para la replicación. Sin embargo, el evento bioquímico más importante observado durante la apoptosis y responsable de las mayorías de las alteraciones anteriormente mencionadas es la rotura específica de infinidad de proteínas celulares llevada a cabo por una familia de cistein-proteasas denominadas caspasas, que se encargan del desmantelamiento celular. Estas proteasas son responsables entre otras cosas, de la desintegración del citoesqueleto, la eliminación del contacto célula-célula, el desmantelamiento de la lámina nuclear, la inhibición de la replicación y de las señales de supervivencia o la activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del ADN. Una vez finalizado este proceso de “autodigestión”, los restos celulares son englobados en unas estructuras típicas de apoptosis denominados cuerpos apoptóticos. Estas unidades están compuestas por restos de citoplasma, orgánulos y fragmentos de cromatina que son envueltos en restos de membrana plasmática. Posteriormente, y antes de que su contenido entre en contacto con el medio extracelular, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células del sistema inmune impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria que dañe a las células más cercanas. Esta característica es fundamental para evitar el daño tisular que originaría la liberación al medio extracelular del contenido citoplasmático de las aproximadamente 100.000 células que en cada segundo mueren durante la vida del ser humano (Vaux y Korsmeyer, 1999).

ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE APOPTOSIS

1. Familia de proteínas caspasas

Las caspasas (cisteín aspartato proteasas) constituyen una familia de proteasas altamente conservadas en la evolución. Las caspasas se sintetizan como proenzimas que contienen un predominio de una longitud variable que está unido a las subunidades enzimáticas. Cuando se produce la activación proteolítica, se libera el predominio y las subunidades enzimáticas sufren un cambio conformacional para constituir la enzima activa.

Su principal función la tienen en las rutas apoptóticas e inflamatorias (Fischer y col., 2003; Shi, 2004; Launay y col., 2005), por esta razón se pueden asociar en dos subfamilias, dependiendo de la función fisiológica. Las caspasas encargadas del control del proceso inflamatorio engloba a las proteasas de la familia de la caspasa 1 (caspasa 1, 4, 5, 11, 12). La subfamilia de la caspasa 3 (caspasa 3, 6, 7, 8, 9 y 10) engloba a los miembros de los procesos apoptóticos. Sin embargo, la descripción de la caspasa 2, que estructuralmente es muy similar a la familia de la caspasa 1 pero que está implicada en procesos apoptóticos, ha obligado a constituir un tercer grupo de caspasas.

La estructura de la procaspasa esta formada por una región o dominio catalítico y otro regulador. La región catalítica de todas las caspasas se sitúa en el extremo Cterminal del péptido y está constituida por dos subunidades: la subunidad mayor de la enzima activa con pesos muy variables, y la subunidad menor que se encuentra junto a la anterior. En ocasiones, entre estos dos dominios aparece un fragmento que puede ser eliminado durante el proceso de maduración de la caspasa. La región reguladora está localizada en el extremo N-terminal en una posición contigua a la subunidad mayor y es eliminada cuando se activa la proteasa. Su longitud es la característica diferencial entre los tres tipos de dominios conocidos y no suelen estar muy conservados aunque presenten fragmentos comunes que permiten la interacción entre proteínas. El dominio efector de muerte DED, (*Death Effector Domain*) descrito en caspasa 8 y 10 es el más largo, el dominio más corto lo presentan las caspasas 3, 6 y 7 (péptido-N), y el dominio CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) presente en las caspasas 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12. Las caspasas ejecutoras de la apoptosis (3, 6 y 7), que tienen todas ellas un predominio corto (péptido-N), están en la célula como dímeros, y requieren un proceso de corte en un residuo aspartato para generar dos subunidades grandes y dos pequeñas. La enzima activa se forma por heterodimerización de estas subunidades, portando dos sitios activos. Estas son las caspasas efectoras más importantes que realizan los cortes de los sustratos celulares en el proceso de muerte celular, bien a otras procaspasas o a otras proteínas intracelulares, preferentemente en dominios efectores de muerte DED.

Las caspasas iniciadoras de la apoptosis (2, 9, 8 y 10), que pueden presentar predominios largos (DED) e intermedios Cardone (1997), se encuentran en la célula

como monómeros y requieren dimerización u oligomerización para su activación (Salvesen y Abrams, 2004). Generalmente, son activadas por agentes citotóxicos, generando una cascada de activaciones de otras caspasas o de otros sustratos. Los dominios DED se caracterizan por la presencia de seis o siete α -hélices antiparalelas de carácter anfipático, las cuales permiten el reclutamiento de otras moléculas de señalización o moléculas adaptadoras formando grandes complejos proteicos que promueven las rutas de señalización apoptóticas o inflamatorias (Shi, 2004).

Las caspasas activadas por citoquinas a través de receptor (1, 4 y 5), que presentan todas ellas predominios intermedios Cardone (1997), caracterizan la ruta extrínseca de apoptosis y también de los procesos inflamatorios.

La activación de las caspasas, también puede ocurrir secundariamente al disparo de las rutas extrínsecas o intrínsecas de apoptosis (Lemasters, 2005; Chipuk y col., 2006). Más de trescientas proteínas han sido caracterizadas como sustratos de caspasas. Receptores de membrana, reguladores citosólicos y proteínas nucleares son las dianas preferidas por las caspasas ejecutoras como caspasa 3, 6 y 7. (Marzo y col., 1998).

2. Familia de proteínas Bcl-2

Bcl-2 es un oncogén que se describe asociado a un *locus* de inmunoglobulinas mediante la translocación t(14:18) en linfomas foliculares (Bakhshi y col., 1985). Es el primer ejemplo de oncogén que inhibe la muerte celular, en lugar de promover la proliferación, como respuesta a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Vaux y col., 1988; McDonnell y Korsmeyer, 1991). Así, la caracterización de Bcl-2 supuso la aparición de una nueva categoría de oncogenes, aquella que engloba proteínas con capacidad de prevenir muerte celular, en lugar de la capacidad de escapar al control de crecimiento.

Estudios cristalográficos pusieron en evidencia la homología de determinados miembros de esta familia de proteínas con toxinas bacterianas capaces de formar poros en bicapas lipídicas (Muchmore y col., 1996), lo que las relacionó con el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial. No obstante, existen teorías que sitúan la acción de estas proteínas como reguladoras de la apertura del poro de transición mitocondrial (MTP) (Shimizu y col., 2000a; Shimizu y col., 2000b; Shimizu y Tsujimoto, 2000).

Los miembros de esta familia de proteínas Bcl-2, término que proviene del inglés *B-cell lymphoma/Leucemia 2 gene*, se caracterizan por poseer uno o varios dominios de homología Bcl-2, Shou (2003), que se corresponden con secuencias α -hélice altamente conservadas. Esta superfamilia se divide en dos grupos en función de su capacidad de promover o inhibir la salida de proteínas proapoptóticas de la mitocondria o tres si se considera la función y el número de dominios homólogos (BH) de Bcl-2:

- Los miembros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1, Bcl-W, tienen cuatro dominios BH (BH1 a BH4) (Boise y col., 1993; Kozopas y col., 1993).
- La subfamilia Bax formada por los miembros proapoptóticos Bak, Bax, Bok y Mtd, poseen tres BH (BH1 a BH3). Los dominios BH1 y BH2 son muy similares a la toxina diftérica (Muchmore y col., 1996).

- La subfamilia “BH3-only” formada por los miembros proapoptóticos Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hlk, NOXA o PUMA, se caracterizan por presentar un único dominio BH3 (Gross y col., 1999a). Recientemente se ha propuesto una división de este grupo en función de la acción del dominio BH3. Unos miembros actúan directamente como proteínas proapoptóticas, y otros, en cambio, lo harían de forma indirecta mediante una inactivación de las proteínas antiapoptóticas (Letai y col., 2002).

Estas proteínas son capaces de formar homooligómeros o heterodímeros y de esta forma determinar la respuesta mitocondrial. Miembros antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-XL tendrían como función impedir la acción de sus rivales proapoptóticos, secuestrando a sus homólogos e impidiendo su cambio de conformación, su oligomerización o la inserción en la mitocondria (Desagher y Martinou, 2000; Perez y White, 2000). En los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 los dominios BH1, BH2 y BH3 estarían formando una estructura a modo de bolsillo hidrofóbico que ocultaría el dominio proapoptótico BH3 (Muchmore y col., 1996; Liang y Fesik, 1997) de forma que quedaría inhibido, impidiendo la oligomerización entre las proteínas proapoptóticas (Chen y Tan, 1998; Kuwana y col., 2002). No obstante, se ha propuesto un mecanismo distinto por el cual las proteínas antiapoptóticas pueden bloquear la oligomerización de Bax y Bak, sin interferir en la interacción de éstas con otros miembros del grupo BH3 (Ruffolo y Shore, 2003). Se ha descrito también que Bcl-2 es capaz de regular la salida de calcio del retículo endoplásmico durante la muerte celular (Foyouzi-Youssefi y col., 2000). Por otro lado, se ha relacionado el aumento de la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 con un desequilibrio del estado redox hacia un ambiente más reductor (Ellerby y col., 1996). El producto del gen *bcl-x* relacionado con el gen *bcl-2*, puede funcionar como un regulador de la apoptosis independientemente de Bcl-2. Del procesamiento alternativo del transcrito *bcl-x*, resultan dos mRNAs de tamaño distinto. El producto del mRNA más grande, Bcl-xL, es similar en tamaño y estructura a Bcl-2 y el más pequeño, Bcl-xS, inhibe la capacidad de Bcl-2 de aumentar la supervivencia. *In vivo*, el mRNA de Bcl-xS se expresa en grandes cantidades en células que tienen alta tasa de recambio, como los linfocitos. Por el contrario, Bcl-xL se encuentra en tejidos que contienen células de larga vida, como el cerebro adulto. La expresión de Bcl-xS puede jugar un papel dominante respecto a Bcl-2 en la regulación de la muerte celular; un mecanismo por el cual podría formar un complejo heterodimérico inactivo con Bcl-2. Una explicación alternativa sería que Bcl-xS y Bcl-xL podrían unirse directamente al mismo regulador de la apoptosis, como Bcl-2. Esta interacción sería debida al dominio amino-terminal, que muestra un alto grado de similitud entre Bcl-2, Bcl-xS y Bcl-xL (Boise y col., 1993). También se ha planteado que Bcl-xL puede funcionar como un canal iónico que regula la permeabilidad de la mitocondria (Muchmore y col., 1996; Minn y col., 1997; Vander Heiden y col., 1997).

Dentro de los miembros proapoptóticos, los más importantes son Bax, Bid, Bad y Bak. Estas proteínas se encuentran de forma monomérica en el citosol (Hsu y col., 1997) y pueden sufrir un cambio conformacional específico, en respuesta a una señal de estrés, que permita su oligomerización y su translocación a la mitocondria

(Gross y col., 1998) promoviendo la liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas. Aunque estas proteínas pueden tener funciones redundantes, se ha propuesto un mecanismo de regulación diferencial en función del estímulo apoptótico, de manera que una u otra sea la forma predominante (Ke y col., 2001; Mandic y col., 2001).

El mecanismo por el que Bax y Bak promueven la liberación de proteínas es objeto de estudio. Uno de los mecanismos escritos propone que, tras la oligomerización, forman un poro que permite la salida de proteínas que se localizan en el espacio intermembrana (Gross y col., 1998; Jurgensmeier y col., 1998). Este modelo supone la permeabilización, exclusivamente de la membrana externa, por lo que la membrana interna permanecería intacta, y no se altera el potencial, la cadena de transporte electrónico o el consumo de O₂ (Shimizu y Tsujimoto, 2000; von Ahsen y col., 2000a).

Esta hipótesis se basa en la homología de estas proteínas con las toxinas bacterianas formadoras de poros, y la evidencia de que Bax es capaz de formar poros y de liberar cyt c en liposomas artificiales (Kuwana y col., 2002). Alternativamente, se ha propuesto que estas moléculas interactúan con proteínas del complejo del poro, como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Shimizu y col., 1999). Por último se ha propuesto un mecanismo de permeabilización mitocondrial en el que las proteínas proapoptóticas inducen y estabilizan un aumento de la curvatura de la membrana mitocondrial externa formando poros lipídicos (Basanez y col., 2002; Kuwana y col., 2002).

En el caso de Bax se ha propuesto que entre los mecanismos iniciadores de la translocación de esta proteína, podrían estar modificaciones del estado redox de la célula y modificaciones en el estado de fosforilación de esta proteína (Hsu y Youle, 1998; Shou y col., 2003; Nutt y col., 2005). Bid se relaciona de forma crucial con la apoptosis mediada por receptores de muerte debido a que es fragmentado principalmente por la caspasa 8 (Li y col., 1998).

El fragmento resultante de la degradación, Bid truncado (tBid), se relocaliza rápidamente en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la permeabilidad de la membrana. Aunque el mecanismo de acción es poco conocido, se ha intentado explicar mediante la eliminación del extremo N-terminal, que le confiere mayor carácter hidrofóbico (Kudla y col., 2000), así tBid se podría unir a algún factor que facilite su localización mitocondrial, como cardiolipina o dilisocardiolipina, un lípido excluido de la membrana mitocondrial que podría funcionar como receptor intracelular (Esposti y col., 2001; Esposti, 2002). Se postula un mecanismo alternativo por el que tBid se inserta en la membrana mitocondrial debido a que el corte producido por caspasas provoca un aumento en la capacidad de oligomerización espontánea, permitiendo que se asocie con la membrana mitocondrial.

3. Disipación del potencial de membrana mitocondrial

La cadena respiratoria genera un gradiente de protones sobre la membrana mitocondrial interna que determina un potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) imprescindible para que tenga lugar la fosforilación oxidativa. Las primeras

observaciones de la implicación del poro de permeabilidad mitocondrial en apoptosis fueron el descubrimiento de señales de muerte que precedían a la disipación del potencial de membrana antes de que otros signos morfológicos fueran detectados. Precedía, por ejemplo, a la exposición de fosfatidil serina, potencial redox celular (Kroemer, 1997), eventos nucleares en apoptosis como la degradación de ADN genómico (Kroemer y col., 1997). De hecho, la bajada del gradiente parece ser más importante que la activación de caspasas, desde que se comprobó que estas pueden ser activadas sin la consecuente muerte celular siempre que el potencial de membrana se mantenga intacto (Boise y Thompson, 1997; Miossec y col., 1997). Además, en algunos modelos de apoptosis la activación de caspasas y nucleasas no ocurre, mientras que la disipación del $\Delta\psi_m$ sí que se observa (Lesage y col., 1997; Lavoie y col., 1998).

El poro de transición mitocondrial (MTP, del inglés *Mitochondrial Transition Pore*) (Crompton, 1999) es un canal multiproteico que comunica el citoplasma con la matriz mitocondrial, atravesando ambas membranas. Este complejo tiene dos funciones: primero, regula la integración del proceso de fosforilación oxidativa en la obtención de energía celular, y segundo, induce la muerte celular cuando se convierte en un canal inespecífico. Este es un canal proteico sensible a Ca^{2+} , fosfato inorgánico, voltaje, especies reactivas de oxígeno (ROS) y pH alcalino, que promoverían que la membrana sufriera un cambio conformacional (Chandra y col., 2000) para permitir su apertura y el paso de solutos de un peso molecular inferior a 1,5 kDa de forma no selectiva (Zoratti y Szabo, 1995; Bernardi, 1996). Este hecho tendría consecuencias catastróficas para la mitocondria porque el potencial de membrana mitocondrial, el cual requiere la impermeabilidad de la membrana interna a los protones, cae y con ello la capacidad de la célula para sintetizar ATP. El bloqueo de la cadena respiratoria dirige la generación de ROS a través de la transferencia directa de electrones a la molécula de oxígeno. Las altas concentraciones de solutos en la matriz mitocondrial generan una presión osmótica que provoca la entrada de moléculas de agua, la expansión de la plegada membrana interna y la eventual interrupción de la membrana externa principalmente liberando factores que ejecutan el programa apoptótico (Grimm y Brdiczka, 2007).

La translocasa ADP/ATP, ANT (del inglés *Adenin Nucleotide translocator*) es una de las proteínas más abundantes del poro mitocondrial (Aquila y col., 1982) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Su papel fundamental es transportar ATP que es sintetizado dentro de la mitocondria al citosol, mediante el intercambio de ADP. El intercambio (ATP^{4-}/ADP^{3-}) crea un gradiente eléctrico por sí mismo (Klingenberg, 1980). En la matriz mitocondrial y asociada a ANT nos encontramos una chaperona con actividad peptidil-propil isomerasa, es ciclofilina D (cypD) (Tanveer y col., 1996). Otra de las moléculas básicas del poro es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), un poro proteico inespecífico también llamado porina mitocondrial (Roos y col., 1982; Benz, 1994) que se encuentra en la membrana mitocondrial externa. ANT y VDAC formarían el núcleo del poro mediante interacciones directas entre ellas, comunicando el citosol con el interior mitocondrial en sitios que se corresponden con una asociación estrecha entre ambas membranas, constituyendo así el poro de transición. Existen varias proteínas que

pueden asociarse a este complejo y regular su actividad, como la hexoquinasa (HK) citosólica, la creatín quinasa intermembranal (CK), y miembros de la familia Bcl-2 (Vander Heiden y col., 1997; Beutner y col., 1998). No obstante, puesto que se han observado modelos en los que ocurre la liberación de proteínas mitocondriales mucho antes de ocurrir la disipación del potencial de membrana, se han sugerido mecanismos alternativos (Gogvadze y col., 2001) donde las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 permeabilizarían, de forma independiente, la membrana mitocondrial externa específicamente, sin producir una alteración ultraestructural ni una despolarización de la mitocondria (Shimizu y Tsujimoto, 2000; von Ahsen y col., 2000a; Von Ahsen y col., 2000b).

RUTAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Existen dos familias de proteínas que se consideran el centro de la maquinaria apoptótica: Caspasas que son principalmente las ejecutoras de la apoptosis (Shi, 2002), y la familia de proteínas Bcl-2, las cuales son los principales reguladoras del proceso (Danial y Korsmeyer, 2004). Generalmente, estas familias de proteínas participan en la apoptosis a través de dos vías: la intrínseca y la extrínseca que están relacionadas a través de la proteína Bid. Esta proteína “BH3-only”, es rota por la caspasa 8 y la forma truncada de Bid (tBid) se transloca a la mitocondria y dispara la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak, dando lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial. En la vía extrínseca, esta permeabilización de la membrana sirve como un bucle amplificador de la activación de las caspasas efectoras (Li y col., 1998; Luo y col., 1998; Gross y col., 1999b). Sin embargo, la caspasa 8 puede activar las caspasas efectoras directamente sin hacerlo a través de la mitocondria.

1. Ruta intrínseca o mediada por mitocondria

La ruta intrínseca es utilizada para eliminar células en respuesta a radiaciones ionizantes, drogas quimioterapéuticas, daño mitocondrial y ciertos procesos en el desarrollo. A continuación del disparo de la muerte, la mitocondria puede ser permeabilizada selectivamente, liderando la liberación del citocromo c y el reclutamiento y la activación de las caspasas de la vía intrínseca, la caspasa 9, en un complejo conocido como apoptosoma (Zou y col., 1999).

La ruta intrínseca incluye la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que ejercen su función en la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondria externa. La liberación de diferentes proteínas proapoptóticas, que están normalmente presentes en el espacio intermembrana de estos orgánulos, se ha observado durante las etapas iniciales de la muerte celular por apoptosis (Cai y col., 1998; Green y Reed, 1998).

La liberación del citocromo c (Cyt c) desde la mitocondria es un paso clave en el inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembrana presumiblemente depende del tipo celular y de la naturaleza del estímulo apoptótico (Gogvadze y col., 2006).

Una vez en el citosol, holocitocromo *c* (que se forma dentro de la mitocondria) se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1) que contiene 12-13 repeticiones de unión proteína-proteína (WD40). Esta interacción facilita la unión de dATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar y formar una plataforma de activación de la procaspasa 9. El resultado de la oligomerización de Apaf-1 es un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas CARD-CARD para formar el llamado apoptosoma. El apoptosoma entonces activa las caspasas iniciadoras (Cain y col., 2002; Shi, 2004). La caspasa 9 activa, rompe y activa sucesivamente, la pro-caspasa 3 y 7 que son las responsables de la rotura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis. (Robertson y col., 2000). Además del citocromo *c*, la mitocondria libera una serie de proteínas que están implicadas en la ejecución de una forma alternativa de apoptosis independiente de la actividad de caspasas. Estas proteínas, tras ser liberadas al citoplasma, son transportadas al núcleo donde participan en la fragmentación de alto peso molecular del ADN (Daugas y col., 2000; Joza y col., 2001). Las proteínas que participan en la rotura del ADN son endonucleasa G (Endo G) y el factor de inducción de apoptosis (AIF), una flavoproteína de 57 kDa (Arnoult y col., 2003). Debido a diferencias en la forma y en el tamaño, así como a las cinéticas de difusión, se presume que es un poro distinto de MTP, e incluso, que es la ruptura de la membrana mitocondrial externa la que permitiría la liberación de estas dos proteínas (Springs y col., 2002; Arnoult y col., 2003). Recientemente un canal lipídico compuesto por ceramida y llamado canal de ceramida se ha visto implicado en la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria. La ceramida difiere de otros lípidos en que pueden formar puentes de hidrógeno intermoleculares para producir columnas de ceramida, cada columna de ceramida formaría canales con distintos estados de conductancia capaces de la liberación de proteínas de más de 60 kDa (Siskind, 2005).

2. Ruta extrínseca o mediada por receptores

La ruta extrínseca es responsable de la eliminación de células durante el desarrollo, la maduración del sistema inmune y la eliminación de tumores mediada por el sistema inmune. Se inicia por la unión de ciertas citoquinas sobre un receptor transmembrana perteneciente a la superfamilia de los receptores para el factor de necrosis tumoral tipo 1, Fas, TNF y TRAIL (Shi, 2004).

Uno de estos receptores lo constituyen Fas (también conocido como CD95 ó APO-1) y su ligando, FasL. FasL se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios de muerte intracelulares de estos receptores agrupados por Fas se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico FADD (del inglés *Fas associated death domain*) mediante un mecanismo de varios pasos (Algeciras-Schimmich y col., 2002). FADD se fija a la forma inactiva de la caspasa 8 mediante interacciones homofílicas con su dominio N-terminal efector de muerte (DEDs). Es dentro de este complejo señalizador inductor de muerte (DISC) donde la caspasa 8 es activada (Salvesen y Dixit, 1999). La activación total de la enzima

sucesivamente promoverá la ruptura de sustratos específicos y de la caspasa 3 ejecutora. Esto último dará lugar a la rotura de distintas dianas celulares y a la muerte por apoptosis (Medema y col., 1997).

ACTIVIDADES REALIZADAS

Las siguientes actividades que se ejecutaron en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos fueron con base a la supervisión de mi asesor externo, la Dra. Erika Azorín Vega

Preparación y determinación de la pureza radioquímica del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20

Un vial con 5mg del conjugado DOTA-anti-CD20 preparado con el anticuerpo quimérico anti-CD20 rituximab (Roche, Switzerland) y el agente quelante bifuncional (p-SCN-Bz-DOTA, piChem, ABX), se reconstituyo en 1ml de buffer de acetatos 0.25M pH 7 y se le adicionaron 4 μl de una solución de $^{177}\text{LuCl}_3$ (Isotope Technologies Garching, Germany) con una actividad específica inicial de 3.9 GBq. La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min y se diluyo con agua inyectable hasta obtener una actividad de 50 kBq/mL. El control de la pureza radioquímica se realizó utilizando TLC y HPLC de exclusión molecular. TLC del purificado ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 se realizó mediante tiras de gel de Silica de 10 cm (aluminum backing, Merck) y una solución de hidróxido de sodio:metanol:agua (1:5:10) como fase móvil. La pureza radioquímica y el factor de retención (RF) fueron evaluados, calculando la relación entre el ^{177}Lu libre y el ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20. La pureza radioquímica y estabilidad del conjugado, se determinó por dos semanas inyectando 40 μL del radiofármaco con una actividad menor a 500 μCi en un sistema de HPLC de exclusión molecular utilizando un sistema isocrático (Waters Empower, USA) y una columna ProteinPak 300SW (7.5 x 300 mm) integrado a un detector de radiactividad usando un gradiente de buffer de fosfatos/acetonitrilo con 0.1%TFA de 20/80 a 95/5 con un flujo de 1 ml/min ($R_t = 11.5$ min $^{177}\text{LuCl}_3$; ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 ($R_t = 8$ min).

Dosimetría celular

La simulación de computadora código PENELOPE se utilizó para determinar la actividad inicial de ^{177}Lu o ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20, para ser administrado de manera que la dosis acumulada recibida por el núcleo de la célula durante periodos de incubación de 24, 48 y 96 horas fueran dentro de un rango de dosis de 0.001Gy a 5Gy. Para la simulación del transporte de electrones y de partículas beta emitidas por ^{177}Lu (espectro enrevesado de las emisiones superiores a 1.5% y con energías superiores a 1keV) fueron consideradas utilizando una geometría lo más cercana posible a la presente en el cultivo celular. Debido a su carácter linfoblastoide no adherente las células Raji tienen una forma redondeada y permanecen suspendidas en el medio. El modelo de simulación consistió en 20 células esféricas de 12 μm de diámetro celular con un núcleo de 11 μm y un espesor de membrana de 0.01 μm . Una fracción del cultivo se modelo como un cubo de medios de cultivo de 158x158x15 μm dentro de un cubo 500x500x200 μm , donde las 20 células eran incrustados cerca uno del otro. La composición del medio de cultivo RPMI ($\text{C}_{4921}\text{N}_{5482}\text{O}_{2536}\text{H}_{5492}\text{S}_{78}\text{Mg}_5\text{K}_2\text{Cl}_5\text{Na}_3\text{P}_{24}\text{Ca}_{11}\text{CO}_2$) se calculó considerando todos los componentes de la formulación y de la densidad del medio (1,08 g / cm^3) se determinó experimentalmente con un picnómetro calibrado con agua a 20 ° C. Las composiciones elementales de la membrana, citoplasma y núcleo se obtuvieron de la Comisión Internacional sobre radiación unidades informe 44 y la fuente se consideró como un haz cuadrangular en una simulación detallada, con una distribución de dosis de -0.05 a 0.05 con 50 divisiones.

La energía depositada (MeV) por desintegración y por gramo de núcleo de la célula se convirtió a Gy (J / kg) / desintegración. La dosis de radiación absorbida en el núcleo de

las células se calcularon multiplicando Gy / desintegración por el número total de desintegraciones (N) que han ocurrido en el núcleo por unidad de radiactividad (becquerel) en el tiempo. La dosis de radiación absorbida en el núcleo de las células tratadas con $^{177}\text{LuCl}_3$ se calcularon considerando sólo la contribución de los medios circundantes al núcleo celular de cada célula y para el $^{177}\text{Lu-DOTA-anti-CD20}$ trató a los valores de captación celular experimentales ($7.7 \pm 1.0 \%$) eran considerar para determinar la proporción de la desintegraciones total calculado que contribuye realmente a la radiación absorbida de la dosis en el núcleo, además de los de los medios de cultivo que rodea.

Cultivo celular y tratamientos

La línea celular de linfoma no Hodgkin Raji (ATCC-CCL-86, USA) se mantuvo y expandió en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal 10% (Gibco, Invitrogen Life Technologies, UK) y 1% de una solución de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, USA) a 37°C en presencia de 5% de CO_2 . A fin de calcular la dosis mínima de radiación para inducir muerte por apoptosis con el radiofármaco $^{177}\text{Lu-DOTA-anti-CD20}$ cultivamos 5.0×10^5 células Raji en botellas de cultivo de 25 cm^2 (Corning Life Sciences, UK) tratándolas con $^{177}\text{LuCl}_3$ (50 μCi), anti-CD20 (0.25mg) o $^{177}\text{Lu-DOTA-anti-CD20}$ (50 $\mu\text{Ci}/0.25\text{mg}$). A diferentes periodos de incubación (0, 24, 48, 72 y 96 h) se muestreo una alícuota de 500 μl para medir diferentes parámetros celulares usando un citómetro celular compacto (Muse™Cell Analyzer de Merck-Millipore, USA).

Evaluación de parámetros celulares

Viabilidad.- La viabilidad de las células después del tratamiento se determinó con el kit de conteo celular y viabilidad siguiendo las instrucciones del fabricante; de forma breve, se tomaron 450 μl del reactivo de conteo y viabilidad y se agregaron a 50 μl de la suspensión celular incubándolas 5 min a temperatura ambiente. Para establecer los límites de fluorescencia y tamaño celular usados para diferenciar una célula viva de una muerta, cultivamos 2.0×10^5 células Raji en un medio depletado de suero bovino fetal 0.1%; al cabo de 3 días, se midió el número de células viables por mililitro de suspensión celular al hacer la comparación de la distribución de la población depletada en suero con respecto a una mantenida en condiciones estándar de cultivo, se definieron los límites de viabilidad.

Apoptosis.- La distribución de células apoptóticas se determinó usando el kit de Anexina V y muerte celular (Muse Merck, Germany) para lo que después de dar el tratamiento correspondiente ($^{177}\text{LuCl}_3$, anti-CD20 o $^{177}\text{Lu-anti-CD20}$) las células colectadas se diluyeron en una solución de bloqueo (albumina de suero bovino 1%) y se incubaron con el anticuerpo anti-Anexina V y el reactivo de muerte celular durante 20 min a temperatura ambiente. La relación de células apoptóticas en cada muestra se determinó mediante la identificación de cuatro poblaciones: (i) células no apoptóticas, células entrando en apoptosis aquellas negativas para anti-Anexina V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD); (ii) células en apoptosis temprana aquellas positivas para anti-Anexina V y negativas para 7-AAD; (iii) células en apoptosis tardía positivas para anti-Anexina V y 7-AAD; (iv) células muertas a través de una vía no apoptótica negativas para anti-Anexina V y positivas para 7-AAD. En este caso, los límites para cada población se establecieron considerando grupos control tratados con estaurosporina (2.5 μM) o dexametasona (15 μM) durante 24h.

Análisis estadístico Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. La comparación múltiple entre la media de los grupos fue evaluada por un ANOVA de una vía usando SPSS 16.0 considerando una $p < 0.05$ estadísticamente significativa.

PRODUCTOS DEL PROYECTO

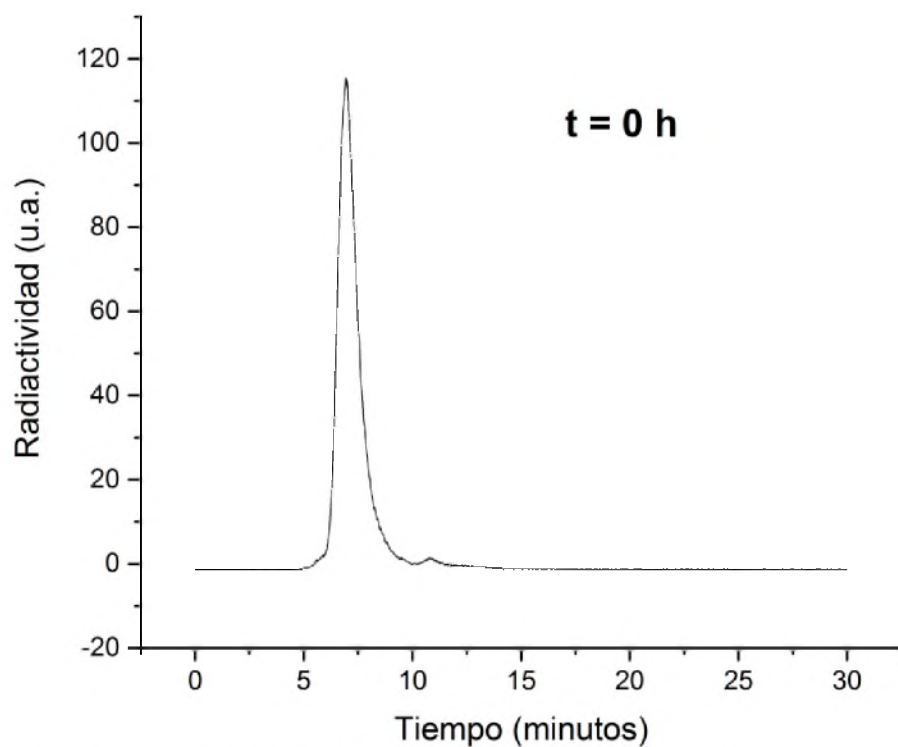


Fig. 1.- Radiocromatograma del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20.

Las pruebas de caracterización química realizadas al ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 demostraron que el radiofármaco obtenido presenta una pureza radioquímica superior al 98% (Fig. 1) y que es estable en suero, debido a que la detección de la radioactividad a los ocho minutos corresponde al tiempo de retención esperado observado para el conjugado (Parul, Thakral. & Suhas Singla. (2014). *An approach for conjugation of ^{177}Lu -DOTA-SCN-Rituximab*. US: *Indian J Med Res.*)

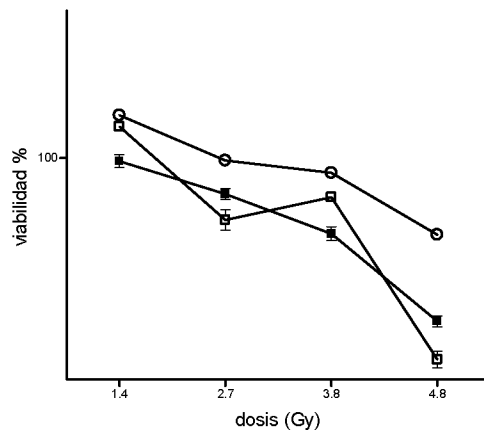


Fig. 2.- Porcentaje de células que sobrevivieron al tratamiento con 0.25 mg de anti-CD20 (○), 50 μ Ci de ¹⁷⁷LuCl₃ (□) o con ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 (■). Media \pm DS.

El análisis de la viabilidad celular (Fig.2) demostró que la administración de ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 (50 μ Ci/0.25mg) es suficiente para afectar las funciones metabólicas de la célula reduciendo su capacidad de sobrevivir en forma significativa a través del tiempo. Tanto el anticuerpo como el radioisótopo redujeron significativamente la viabilidad de las células; sin embargo, el efecto fue aún más evidente cuando ambos se administraron combinados en una misma formulación. La dosimetría celular apoyada por simulación Monte Carlo permitió calcular la dosis absorbida por el núcleo de la célula a los diferentes tiempos. El cálculo de dosis a núcleo considerando la contribución de las emisiones beta del ¹⁷⁷Lu y la composición celular y del medio en una geometría que simulaba las condiciones presentes en el cultivo *in vitro* resultó en valores de dosis en un rango de 1-5 Gy (Volkert, W.A. & Hoffman, T.J. . (1999). *Therapeutic Radiopharmaceuticals.. US: Chemical Reviews.*).

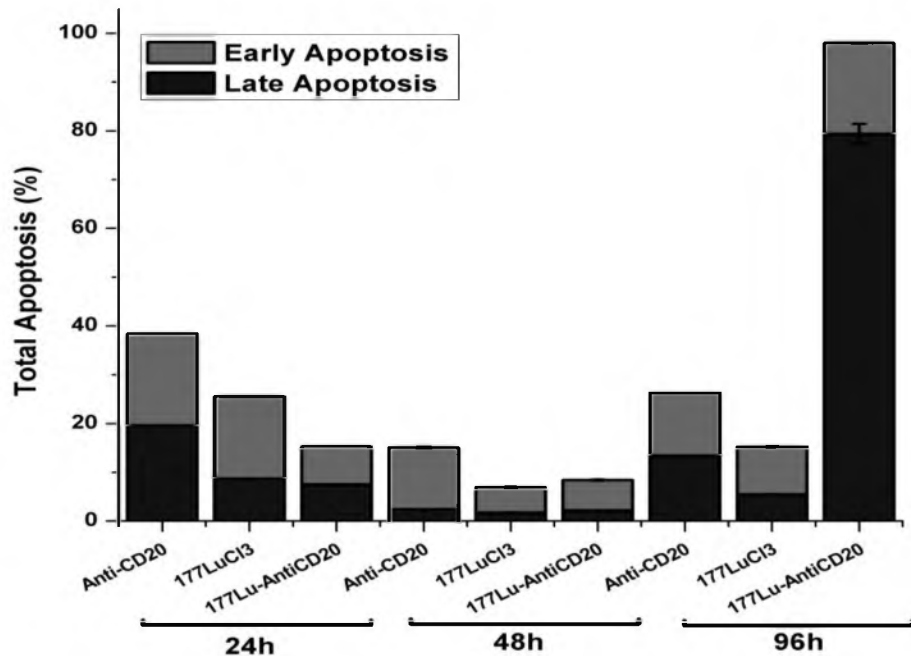


Fig. 3.- Porcentaje de células que entran en apoptosis por el tratamiento con 0.25 mg de anti-CD20 (barra blanca), 50 μ Ci de ¹⁷⁷LuCl₃ (barra gris) o con ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 (barra negra). Media \pm DS.

Con la intención de comprender los mecanismos celulares involucrados en la inducción de muerte celular y la temporalidad con que cada uno de ellos va actuando se determinó el incremento en el porcentaje de células en apoptosis (Fig. 3).

La detección de células en apoptosis (Fig. 3) mostró que en el tratamiento del anti-CD20 a las 24h, el anti-Cd20 produce un equilibrio entre apoptosis temprana y apoptosis tardía debido a la cascada de señalización rápida a través de los receptores de muerte superficiales. El tratamiento con ¹⁷⁷LuCl₃ a las 24h, 48h y 96h muestra que predomina una apoptosis temprana; debido a un posible aumento en la permeabilidad de la membrana, por la interacción de las partículas beta tanto con el medio como con la célula, lo que induce la formación de radicales libres que a su vez actúan a nivel mitocondrial. Esta Interacción mitocondrial está relacionada con el mecanismo de apoptosis temprana. El tratamiento con el ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 a las 24h con una dosis aproximadamente de 1.4Gy, se observa un equilibrio entre apoptosis temprana y apoptosis tardía. Sin embargo la apoptosis temprana, se incrementa con respecto a la tardía a las 48 horas. Esto se explica debido a que el conjugado está unido a la membrana celular y el efecto de la entrega continua de radiación beta en la cercanía del núcleo produce rupturas dobles en el ADN lo cual activa los mecanismos de reparación celular; pero también de radiosensibilidad. Por lo que a las 96horas, esta irradiación sostenida con la consecuente generación de una alta densidad de ionización, conlleva a un incremento de la apoptosis tardía, que resulta en la muerte celular apoptótica

(Lundberg A.S. and Weinberg R.A. . (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. US: Eur. J. Cancer.)

Dentro del procedimiento de operación y limpieza del citometro de flujo, se estableció que para el protocolo de medición con el kit de Anexina V siempre debe realizarse una limpieza completa del sistema al leer dos muestras ya que esto afecta considerablemente la precisión de las lecturas y así se evitan falsos positivos producidos por los remanentes celulares en las paredes del capilar. Se estableció que si se obtiene el mismo resultado al hacer la lectura de dos muestras distintas debe sospecharse a un bloqueo del flujo y se recomienda hacer el backflush y hacer la lectura de un control negativo (agua) hasta encontrar una lectura de cero eventos en esta muestra. En cuanto a la purga y limpieza completa del sistema, se estableció que esta función debe ejecutarse de modo rutinario al final de cada día, o entre ensayos si se necesita una limpieza a fondo por el hecho de que la suspensión celular este muy concentrada. También se puede ejecutar este ciclo de limpieza para limpiar el sistema de fluido o si se sospecha que hay aire en las líneas de flujo del equipo. Se estableció que después de 20 lecturas se solicitará el vaciado de los contenedores de desechos y se restablecerán los niveles de los fluidos.

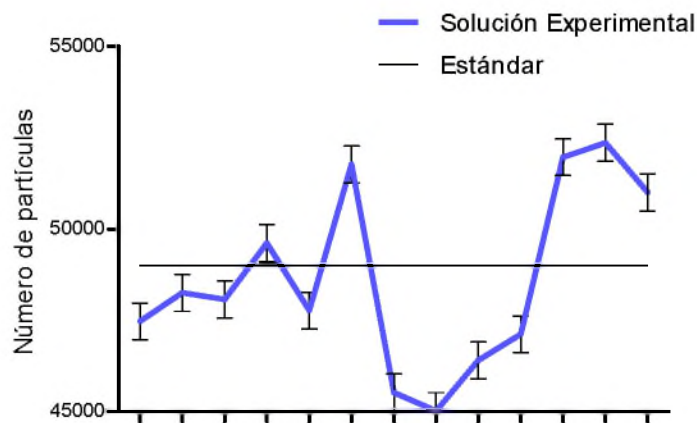


Fig.4. Representación gráfica del conteo de perlas fluorescentes presentes en el estándar con el que se califica el desempeño del sistema Muse.

En la figura 4 se sustenta que el citometro de flujo, fue calibrado correctamente para proporcionar resultados confiables para las posteriores lecturas de los experimentos. Teniendo los resultados del conteo de perlas fluorescentes, la mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia. Dando una medición cuantitativa y multiparamétrica de ciertas características celulares en una mezcla compleja y estadísticamente adecuada de células.

CONCLUSIONES

El apego al procedimiento de mantenimiento y limpieza del sistema Muse y el seguimiento de la protocolo de tinción que se optimizaron asegura la obtención de medidas de apoptosis inducida por radiofármacos teranósticos confiables, precisas y repetibles.

El anti-CD20 induce tanto apoptosis temprana como tardía en la que predomina ninguno de los dos estados activados. La dosis de radiación absorbida en el núcleo de la célula por el tratamiento con el cloruro de lutecio-177 no es suficiente para inducir apoptosis tardía de manera significativa. Una dosis de 5 Gy de ¹⁷⁷Lu-DOTA-antiCD20, induce 80% de apoptosis tardía **en las células de linfoma, lo que resulta en muerte celular apoptótica.**

Este trabajo sienta las bases para proponer estudios de capacidad clonogénica celular, preclínicos y clínicos a fin de evaluar la posible reducción de la actividad administrada de ¹⁷⁷Lu-DOTA-antiCD20 en el tratamiento de linfomas, utilizando 70% menos de la actividad actualmente prescrita (de 45 mCi/m² a 11-12 mCi/m²).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Kinders R., et al. Phase 0 clinical trials in cancer drug development: from FDA guidance to clinical practice. *Molecular interventions*. 7: 325-334 (2007).
- [2] Marchetti S. and Schellens J.H.M. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *British Journal of Cancer*. 97: 577 – 581 (2007).
- [3] Kelloff G.J., et al. The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin. Cancer Res*. 11: 7967–7985 (2005).
- [4] Banerjee S., et al. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem. Rev*. 115: 2934-2974 (2015)
- [5] Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 278–287 (2012).
- [6] Press, O. W. Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphomas: a historical perspective. *Semin. Oncol*. 30, 10–21 (2003).
- [7] Press, O. W. & Rasey, J. Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists. *Semin. Oncol*. 27, 62–73 (2000).
- [8] Wittrup, K. D., Thurber, G. M., Schmidt, M. M. & Rhoden, J. J. Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents. *Methods Enzymol*. 503, 255–268 (2012).
- [9] Welch, M.; Redvanly, C., 2003, *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, 5a ed. Inglaterra, Wiley. 340-369.
- [10] Gopal, B., 2004, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 5ª ed. USA, Springer. 219-222.
- [11] Dobson, L., 1964, *Las radiaciones ionizantes y la salud*. OMS, Estocolmo, Suiza. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_6_spa.pdf. (Fecha de consulta: agosto 2010).
- [12] Camaras, R.; Campbell, J., *El manejo de las radiaciones Nucleares*. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/094/htm/ra dia 2.htm>. (fecha de consulta: agosto 2010).
- [13] Cotter T.G. and Martin S.J. *Techniques in Apoptosis, a user's guide*. Portland Press.
- [14] Clarke P.G.H. Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways. *Trend Pharmacol. Sci.*, 23: 308-309, 2002.
- [15] Vaux D.L. Aguila H.L. and Weissman I.L. Bcl2 prevents death of factordeprived cells but fails to prevents apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol*, 4: 821-4, 1992.

- [16]McConkey D.J., Hactzell P., Nicoreta P. and Osrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thyrocytes. *Faseb J.*, 3: 1843-1849, 1989.
- [17]Willie A.H. Chromatin cleavage in apoptosis; association of acondensed chromatin morphology and dependence on macromolecular sythesis. *J. Pathol.*, 142: 67-77, 1984.
- [18]Evan G.I. and Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348, 2001.
- [19] Ministerio de Salud y Consumo., 1993, Real Decreto 767/1993, de 21 de mayo, por el que se regula la evaluación, autorización, registro y condiciones de dispensación de especialidades farmacéuticas y otros medicamentos de uso humano de fabricación industrial”. Disponible en: [http://vlex.com/vid/dispensacion-farmacauticas-industrialmente-](http://vlex.com/vid/dispensacion-farmacauticas-industrialmente-15380883) 15380883. (Fecha de consulta: abril 2010).
- [20]Decristoforo C, Santos I, Pietzsch HJ, Kuenstler JU, Duatti A,Smith CJ., 2007, Comparison of in vitro and in vivo properties of [99mTc]cRGD peptides labeled using different novel Tc-cores, *Nucl Med Mol Imaging*, 51: 33-41.
- [21] Saha B., 1997, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 4^a ed. New York. Springer. 436-449.
- [22] Kowalsky J.; Perry J., 1987, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice*, Norwalk, Connecticut. Appleton & Lange. 198-218.
- [23]Mallol J., 1995, *Medicamentos radiactivos*. 2^a ed. Madrid, Díaz de Santos. 226-234.
- [24]Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios., 2010, *Real Farmacopea Española*, Madrid. Disponible en: <http://www.portaleami.org/encuentros/viiimadrid/docs/1305/C.Morera.pdf>. (Fecha de consulta: abril 2010).
- [25] Mallol, J., 2008, *Manual de Radiofarmacia*. Ed. Diaz de Santos. España. Pp. 52.
- [26]Torchihin V., 1995, *Handbook of Target Delivery of Imaging Agents*, CRC Press Inc. 386-395
- [27] Stewart D. Lutetium. *Chemicool Periodic Table*. [actualizado 17 Octubre 2012; citado 26 Enero 2013]. Disponible en: <http://www.chemicool.com/elements/lutetium.html>
- [28]Lutecio. [actualizado 2013; citado 16 Enero 2013]. Disponible en: http://www.educaplus.org/sp2002/4propiedades/4_71.html

- [29]Recio Miñarro J. Lutecio. [actualizado 19 Marzo 2013; citado 26 Marzo 2013]. Disponible en: <http://www.quimicaweb.net/tablaperiodica/paginas/lutecio.htm>
- [30]Jiménez A. Lutecio. [citado 16 Enero 2013]. Disponible en: <http://www.uam.es/docencia/elementos/spV21/sinmarcos/elementos/lu.html>
- [31]Nicolas G, Giovacchini G, Müller-Brand J, Forrer F. Targeted radiotherapy with radiolabeled somatostatin analogs. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2011; 40: 187-204.
- [32]Crudo JL. Lutecio-177, un radionucleído apropiado para radioinmunoterapia y terapia radionucleídica de receptores peptídicos. *Avances en radiofarmacia*. Silvia Verdera E, Gómez de castiglia S, editores. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear. 2009: 5-6.
- [33]Kowalsky RJ, Falen SW. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. Washington, DC: American Pharmacists Association; 2004.
- [34]Zalutsky, M.R. Chapter 24: Radiolabeled antibodies for tumor imaging and therapy. *Handbook of Radiopharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd. Edited by Welch, M.J.
- [35]Hernandez, M.C., Knox, S.J. (2004). Radiobiology of Radioimmunotherapy: Targeting CD20 B-cell antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, Vol. 59, No. 5, pp. 1274-1287.
- [36] Genentech, Inc. (n.d.) Inseto de Rituxan®, consultado el 29 de agosto de 2015, disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103705s5367s5388lbl.pdf.
- [37]Zelenetz, A.D.; Abramson, J.S.; Advani, R. H. (2010) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of National Comprehensive Cancer Network*. Volume 8, Number 3.
- [38]Murrieta-González, H.; Villalobos-Prieto, A.; García-Correa, S. (2009). Linfoma: Aspectos clínicos y de imagen. *Anales de Radiología México*, 1: 81-97.
- [39]Friedberg, J.W. (2008). Treatment of Non-Hodgkin's Follicular Lymphoma: The Old and The New. *Seminars in Hematology*
- [40]Friedberg, J.W. (2008). Treatment of Non-Hodgkin's Follicular Lymphoma: The Old and The New. *Seminars in Hematology*.

[41]Evan G. and Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322, 1998.

[42]Lundberg A.S. and Weinberg R.A. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 35: 531-539, 1999.

[43]Manfredi I.I. p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore. *Molecular cell*, 11: 552-554, 2003.

[44]Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K.H., and Oren M. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.*, 9: 2170- 2183, 1995.

[45]Marchenko N.D., Zaika A., and Moll V.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *J. Biol. Chem.*, 275: 16202-16212, 2000.