

00381

14
Lej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DEL PROCESO APOPTOTICO
EN CELULAS HeLa INDUCIDO CON
CISPLATINO**

T E S I S
Que para obtener el grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

p r e s e n t a

VILMA MALDONADO LAGUNAS

1996

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ORTEGA SOTO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OF NUM. P-3075

DR. ARTURO ORTEGA SOTO
P R E S E N T E.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado como Director de Tesis de (n) alumno(a) VILMA MALDONADO LAGUNAS, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulado: ESTUDIO DEL PROCESO APOPTOTICO EN CELULAS HeLa INDUCIDO CON CISPLATINO."

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Dirección de la Facultad, los ha designado como asesores para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el (a) alumno (a) antes mencionado (a) tiene los méritos para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA).

PRESIDENTE : DRA. ANNIE PARDO SEND
VOCAL : DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ
VOCAL : DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
VOCAL : DR. ARTURO ORTEGA SOTO
SECRETARIO : DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA
SUPLENTE : DRA. MARIA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
SUPLENTE : DRA. MARTA ALICIA MEXIQUER TRAHETA

Sin más por el momento y en espera de su respuesta, quedo de ustedes.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F. 21 de Septiembre de 1996
JEFE DE LA DIVISION

Margarita Calles
DRA. MARGARITA CALLES ORTEGA



DIV. EST. POSGRADO

MCO/ASR/cbb.

AGRADECIMIENTOS.

A los miembros del jurado del examen de grado, por su tiempo y sus valiosos comentarios.

Al Dr Arturo Ortega Soto por su guía y apoyo.

A Jorge Melendez Zajgla.

**A mis padres: Rosa María Lagunas Lopez
Isaias Maldonado Cisneros**

**A mis hermanas:
Bhetsaida
Dulce María
Shirley.**

ESTUDIO DEL PROCESO APOPTOTICO EN CELULAS HeLa
INDUCIDO CON CISPLATINO.

INDICE.

	Pagina
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Generalidades de la apoptosis.....	3
La proteína p53.....	10
La proteína Bcl-2.....	14
El factor de transcripción AP-1.....	16
El factor de transcripción NF-kB.....	18
Cisplatino.....	20
Justificación.....	22
Objetivos.....	23
Material y Métodos.....	24
Resultados.....	29
Discusión.....	36
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42

Resumen.

Células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino presentaron características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis. El cisplatino provocó muerte celular de una manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al fármaco. Se demostró que esta muerte corresponde al fenómeno apoptótico mediante estudios morfológicos con las tinciones histológicas de Feulgen (Schiff) y bromuro de etidio, que revelaron una condensación citosólica y nuclear después de 18 horas de tratamiento. Las células tratadas con cisplatino presentaron una fragmentación del ADN que se detectó *in situ* con la técnica de TUNEL. Al someter a electroforesis el ADN de las células con tratamiento se encontró que existía una fragmentación inicial entre las 12 y 15 horas con productos de alto peso molecular y una ruptura posterior (18 hrs) que produjo fragmentos múltiples de 200 pb, con un patrón electroforético de escalera (Ladder). Ya que el cisplatino causa daño al ADN y genera radicales libres, se analizó la actividad de unión de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, implicados en la respuesta de las células al estrés oxidativo. Al inducir apoptosis mediante la administración de cisplatino, no se encontraron cambios notables en los niveles de actividad del factor AP-1, al ser analizados mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Por el contrario, los niveles de actividad de NF- κ B se incrementaron sensiblemente durante el curso temporal, particularmente de manera previa a la aparición de la morfología apoptótica. Al analizar la distribución celular del oncogene p53, se encontró que este se acumuló en el núcleo a las 12 hrs después del tratamiento evadiendo la degradación causada por E6. Ya que p53 regula negativamente a Bcl-2, también analizamos los niveles intracelulares de esta proteína, los cuales disminuyeron a tiempos muy cortos después de iniciar el tratamiento, aún antes de los cambios encontrados en p53. Estos resultados apuntan a que la apoptosis podría ser dependiente de p53 y Bcl-2 en esta línea celular. De la misma manera señalan el papel primordial de NF- κ B en el proceso apoptótico en este sistema.

ABSTRACT.

Exposition of HeLa cells to several cisplatin doses result in a concentration-dependent loss of cell viability. By specific DNA staining, an important nuclear condensation and fragmentation was present, characteristic of apoptosis. None of the drug concentrations used induced necrosis. In the condensed nuclei, a clear fragmentation was observed, as assessed by the TUNEL technique. With electrophoretic assays, it was apparent that the first DNA alteration was present 9 hours after exposure, with a high molecular weight fragmentation, followed by the classic "ladder" pattern of low molecular weight fragmentation, 18 hours after exposure, in discordance with previous reports. In order to get more insight into this process we analyzed the expression and distribution of genes involved in the apoptotic process in other models. Bcl-2 expression decreased at very early times after exposure to the drug. p53 protein was scarcely present and presented a predominantly cytoplasmic distribution in control cells and a clear redistribution was obtained twelve hours after exposure to cisplatin. This is particularly relevant since HeLa cell line has loose most of its p53 protein as a result of papillomavirus E6-induced degradation. The levels of NF-kB increased after the cisplatin treatment, while AP-1 activity remained unchanged. These results point toward the notion that, during the apoptotic process induced by cisplatin, HeLa cells increase the activity of NF-kB, an oxidative-stress responsive factor, decrease the expression of Bcl-2 protein and, concordantly, present a p53 "escape" mechanism from E6-directed degradation, allowing its cellular redistribution.

INTRODUCCION

Generalidades de la apoptosis

La muerte celular es un fenómeno biológico que ocurre bajo diversas circunstancias. Hasta hace algunos años se consideraba como un evento pasivo y accidental causado por la exposición de la célula a un medio ambiente inapropiado. Si bien es cierto que las células pueden morir pasivamente, cuando la célula se expone a un daño severo que provoca una falla catastrófica en la integridad celular, existe otro tipo de muerte celular, denominada apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular responsable de la eliminación de células en una variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Cuando las células se apoptotizan, presentan una morfología muy característica: la célula pierde contacto con las células vecinas, el citoplasma se condensa, la célula pierde de $1/3$ a $1/2$ de su volumen original, la cromatina se compacta y se desplaza hacia la envoltura nuclear, el nucléolo se disocia y el núcleo se disgrega en fragmentos discretos, la membrana celular sufre convoluciones formando vesículas que contienen citoplasma, organelos y, en algunos casos, contenido nuclear. Estas vesículas se desprenden de la célula como cuerpos discretos denominados cuerpos apoptóticos. De aquí el nombre de apoptosis que en griego significa "desprendimiento" [Wyllie AH, et al. 1980., Kerr JRF., 1994., Raff MC., 1992., Williams GT., 1994]. Las células vecinas o macrófagos engloban y digieren los cuerpos apoptóticos, de tal manera que en ningún momento el contenido celular tiene contacto con el medio externo y por lo tanto no desencadena en el organismo una respuesta inflamatoria [Williams GT., 1994].

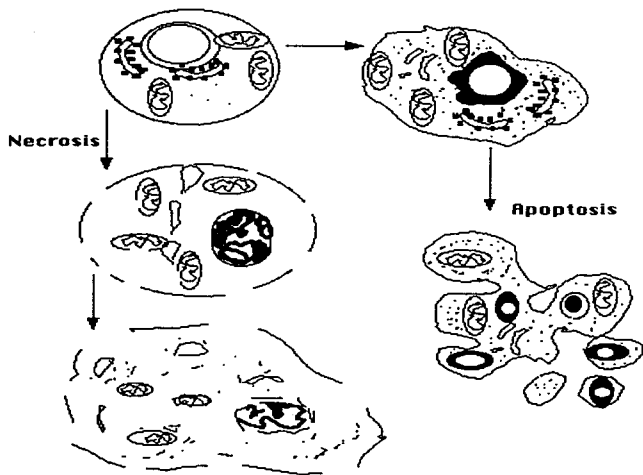


Figura 1. Principales tipos de muerte celular: Apoptosis y Necrosis.

La primera evidencia de este tipo de muerte celular surge en el año de 1965 cuando Kerr [Kerr, J.F.R., et al., 1972.] realizaba un estudio sobre lisosomas en hígado de rata con isquemia y observó que algunas células que mostraban señales de muerte celular tenían una morfología peculiar, diferente a las células necróticas. Al hacer una tinción histológica para detectar fosfatasa ácida encontró que a diferencia de las células necróticas, estas mantenían los lisosomas intactos. Estudios posteriores con microscopía electrónica corroboraron las diferencias morfológicas entre células apoptóticas y necróticas [Buja, LM, et al., 1993] (Figura 1).

Un marcador bioquímico de la apoptosis es la ruptura de la cromatina en fragmentos múltiples de 180 pares de bases, los cuales, al someterse a electroforesis, presentan una apariencia de "escalera" (ladder en inglés). Estos fragmentos provienen de cortes específicos en las regiones internucleosomales del ADN [Bortner et al., 1995., Kaufman SH.1989., Wyllie, A.H., 1980]. Ha existido un considerable debate sobre el papel preciso de la fragmentación del ADN durante la apoptosis y el mecanismo por el cual se lleva a cabo. A pesar de la amplia evidencia en favor de que la fragmentación de ADN en fragmentos de bajo peso molecular es un marcador de la apoptosis, existen reportes de muerte celular por apoptosis en ausencia de este tipo de fragmentación. Al parecer, la fragmentación internucleosomal del ADN ocurre consistentemente en células del sistema inmune. Por el contrario, en células epiteliales, células embrionarias, en células de insecto durante la metamorfosis, en hepatocitos cultivados con TGF- β 1 o en células HeLa tratadas con ocratoxina no se observa este tipo de fragmentación; en las cuales solo se detectaron fragmentos de ADN de alto peso [Ucker DS, et al., 1992., Tomei, et al., 1993]. No se sabe con certeza si en estos casos la

fragmentación realmente no existe o simplemente las técnicas de detección no son lo suficientemente sensibles [Cohen JJ, and Duke RC, 1984., Schulze-Osthoff K, et al., 1994., Compton MM., 1992].

Varios grupos de investigación han detectado fragmentos de alto peso molecular (50-300 Kb) durante el proceso apoptótico. Por ejemplo, timocitos de rata tratados con dexametasona presentan fragmentos grandes además de los fragmentos internucleosomales. Fragmentos grandes similares con o sin la presencia de fragmentos pequeños han sido observados en linfocitos tratados con teniposido y en varias líneas celulares epiteliales tratadas con TGF- β 1, etoposido o deprivadas de suero [Dusenbury CE, et al., 1991., Oberhammer F, et al.1993., Brown DG, et al., 1993., Cohen GM, et al., 1994]. Estos fragmentos de ADN de alto peso molecular han sido postulados como precursores de los fragmentos oligonucleosomales [Sun X-M, and Cohen GM., 1994].

El rompimiento del ADN durante la apoptosis lo llevan a cabo enzimas específicas. Varios candidatos han sido propuestos: la ADNasa I la cual requiere Ca^{2+} y Mg^{2+} y es inhibida por Zn^{2+} ; la ADNasa II, una enzima lisosomal que tiene un pH óptimo de 5.5 y funciona independientemente de los cationes y la NUC 18, una enzima nuclear que es dependiente de Ca^{2+} / Mg^{2+} y es inhibida por Zn^{2+} . El hecho que existan diferentes tipos de fragmentación de ADN ha llevado a postular la existencia de más de una endonucleasa responsable de la fragmentación del ADN durante la apoptosis, en diferentes tipos celulares y aún en la misma célula [Arends MJ, et al. 1990., Wyllie AH., 1980., Barry MA, and Eastman A., 1992., Wyllie AH, et al., 1992.].

Walkert *et al.* (1996) han propuesto un modelo muy interesante del mecanismo de fragmentación del ADN en apoptosis, tomando en cuenta la estructura del ADN, el tamaño de los fragmentos de ADN y los requerimientos de iones que se han reportado en diferentes sistemas. Este modelo postula tres niveles de fragmentación del ADN: El primer nivel sería una fragmentación en regiones de unión del ADN al esqueleto proteico nuclear en sitios ricos en AT que abarcan regiones de ADN de 300 Kb - 1 Mb, estos sitios los denominaron Sitios I. Los cortes en estas regiones los haría una endonucleasa constitutiva que requiere bajos niveles de magnesio. El segundo nivel de fragmentación se llevaría a cabo en los denominados Sitios II, que involucra también regiones de unión entre el ADN y el esqueleto proteico nuclear. Estos son sitios ricos en G:C y abarcan mínimo un asa de ADN de 50 Kb y máximo 6 asas de ADN con un total de 300 Kb. En este paso se necesita la presencia de Mg^{2+} y de bajas concentraciones de Ca^{2+} . Se postula que con este corte el ADN ya no se mantendría unido al citoesqueleto y se uniría a la periferia nuclear. Finalmente el tercer nivel es el rompimiento internucleosomal (Sitios III) de 200 pb o múltiplos, en este paso se requiere Mg^{2+} y altas concentraciones de calcio (Figura 2). Estos autores proponen que la endonucleasa responsable de la fragmentación a los tres niveles es la ADNasa I ya que se trata de una enzima que modula su actividad, especificidad de sustrato y su mecanismo de acción por las concentraciones de cationes, y aunque esta proteína tiene en su estructura una secuencia señal de secreción y a nivel intracelular se ha localizado en el Reticulo Endoplásmico y Aparato de Golgi, existen indicios que demuestran que puede encontrarse también en núcleo. [Walkert PR, et al., 1996].

La apoptosis juega un papel vital en diversos procesos biológicos, ayudando a mantener la homeostasis de las poblaciones celulares. Existe un balance entre la proliferación celular y la apoptosis que regula el crecimiento de las poblaciones celulares. La apoptosis es responsable de la eliminación de células durante el desarrollo embrionario de los organismos, durante la neurogénesis, en el recambio celular de los tejidos en condiciones normales, durante procesos involutivos normales, en la regresión de hiperplasias, además de jugar un papel muy importante en el sistema inmune al eliminar células autorreactivas [Wyllie AH, 1992., EllisRA, et al., 1991., Meyn RE, et al., 1994.,Cotter TG, et al., 1990]

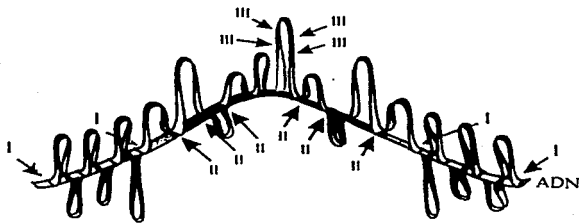


Figura 2. Estructura del ADN y posibles sitios de corte que producen fragmentos de alto peso molecular (Sitios I y II) y fragmentos de bajo peso molecular (Sitios III) durante la apoptosis.

Por medio de la apoptosis se eliminan células que podrían ser dañinas al organismo, como aquellas que tuvieran mutaciones en el genoma o que estuvieran infectadas con virus, de tal forma que la modificación de este proceso puede dar lugar a alteraciones fisiopatológicas. De esta manera, lo encontramos implicado en la génesis de atroñas patológicas y en procesos cancerosos, en donde se encuentra alterado el índice apoptótico. Ciertos virus pueden suprimir la apoptosis, prolongar la viabilidad de las células huésped y optimizar la producción de partículas virales [Haecker G and Vaux DL, 1994].

El proceso apoptótico se presenta en todos los organismos multicelulares incluyendo las plantas y se ha encontrado en algunos organismos unicelulares como *Trypanosoma cruzi* [Ameisen IC, et al. 1995] y *Tetrahymena thermophila* [Christensen ST, et al., 1995].

Al encontrarse que la apoptosis se prevenía con inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas, se dedujo que la célula tenía un papel activo en este proceso y que era necesaria la expresión de una batería de genes específicos para que se llevara a cabo. Aunque actualmente se ha encontrado que no en todos los tipos celulares la apoptosis es afectada por estos inhibidores e incluso en algunos casos inducen apoptosis, es bien aceptado el requerimiento de la expresión de genes específicos en el proceso apoptótico [Martin J., 1993]. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* la expresión de los genes *ced-3* y *ced-4* son indispensables para la apoptosis y el producto del gen *ced-9* actúa como supresor de la apoptosis [Yuan J, and Horovotz HR., 1990] En mamíferos se han encontrado varios genes relacionados con el proceso apoptótico. Algunos de los genes más importantes son los que codifican para las proteínas p53 y Bcl-2.

La proteína p53.

El gen p53 humano se localiza en el cromosoma 17 región 17p13, codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos descrita originalmente en 1979 como una proteína capaz de formar un compuesto oligomérico con el antígeno T de SV40 en células transformadas [Levine AJJ, et al., 1991.]. Los niveles altos de p53 observados en células transformadas y la habilidad del gen p53 para cooperar con el gen ras en fibroblastos de embrión de rata en ensayos de transformación indicó inicialmente que p53 era un oncogene. Diez años más tarde se demostró que solo la forma mutante de p53 tenía capacidad de transformación celular. Dos tipos de evidencias demostraron que p53 es un gene supresor de tumores: a) Alteraciones somáticas del gen p53 han sido reportadas en un gran número de cánceres, sugiriendo que este evento es requerido para la transformación; las mutaciones del gen p53 son una de las alteraciones genéticas mas frecuente detectada en cánceres humanos. b) La expresión de p53 normal es capaz de suprimir la transformación de células por otros oncogenes, de inhibir el crecimiento de células malignas *in vitro* y de suprimir el fenotipo tumorigénico de células transformadas [Lowe SW, et al., 1993., Frebourg T and Friend S.H., 1992., Kern SE, et al., 1991].

Se han sugerido diversos mecanismos por los cuales p53 es capaz de actuar como un gen supresor de tumores. Resultados obtenidos por Bert Vogelstein [Kern SE, et al. , 1992] confirmaron que p53 tiene actividad transcripcional. p53 forma un complejo tetramérico y se une a secuencias específicas de ADN (5'-RRRCA/TT/AGYYY-3'). Se han identificado diversos genes que contienen en su región regulatoria el

elementos que responden a p53 [EL-Deiry WS, et al., 1993], por ejemplo, el gen que codifica para la proteína p21 (WAF1/CIP1) un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDKs), el gen del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), GADD45 [Finlay CA., 1993], mdm-2 (mouse double minute 2), la cinasa de fosfocreatina, la ciclina G y bax, son genes inducidos por p53, mientras que c-myc y Bcl-2 son reprimidos por p53 [Selvakumaran M, et al., 1994]. Esta proteína también regula la expresión de c-fos y c-jun, aunque no contienen la secuencia consenso, probablemente por una interacción con la maquinaria de transcripción [Atadja P, et al., 1995].

Se ha especulado que p53 tenga un papel en el control de la replicación del ADN ya que es capaz de inhibir la unión de el antígeno T de SV40 a la polimerasa alfa, la cual es requerida para la replicación de SV40 [Friedman P, et al., 1990]. Recientemente se ha demostrado que p53 también interviene en la regulación traduccional; se ha encontrado que se asocia con varios componentes de la maquinaria de traducción y con las regiones 5' no traducida de los transcritos. Dos genes que se controlan a este nivel es el propio gen de p53 y el gen de CDK4 [Ewen M.E. and Miller S.J., 1996].

La proteína p53 es de vital importancia en el ciclo celular, dado que es capaz de encender y apagar diversos genes que permiten o limitan la entrada a las diversas fases del ciclo. En células normales los niveles de p53 son muy bajos, si bien estos aumentan después del tratamiento con agentes que dañan el ADN. Se ha propuesto que p53 está involucrado en la respuesta al daño a ADN, produciendo arresto en la fase G1 del ciclo celular para permitir la reparación del ADN antes de entrar a la fase S o conducir a la célula a la vía apoptótica si el daño es

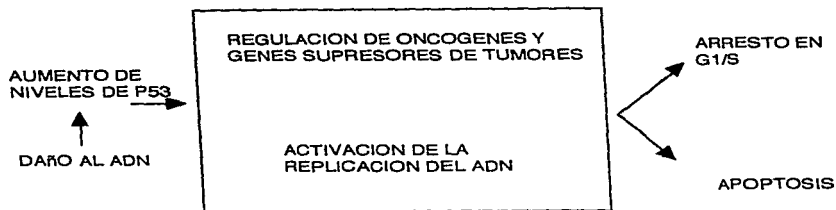
severo [Agarwal ML, et al., 1995] (Figura 3). Guillouf *et al.* (1995 han demostrado que p53 normal modula también la salida de la fase G2 de células de leucemia mieloide expuestas a radiación gama.

Varias proteínas regulan la función de p53, algunas de las cuales juegan un papel en el desarrollo de enfermedades y de cáncer. La infección por ciertos papilomavirus humanos contribuyen al desarrollo de cáncer cervicouterino. Una de las oncoproteínas de estos virus, la proteína E6, interactúa con p53 y la dirige a una rápida degradación por la vía dependiente de ubiquitina. Así, células que contienen E6 no pueden inducir a p53, siendo funcionalmente carentes de esta proteína, con la consecuente pérdida de las actividades de arresto del ciclo [Huibregtse JM, et al., 1993., Scheffner M, et al., 1990].

Las células que expresan p53 mutado, al igual que las que están infectadas con papilomavirus de alto riesgo, no son capaces de arrestar la progresión del ciclo, reparar el daño y continuar proliferando. Este hecho dirige a la célula a una inestabilidad genética y eventualmente a la malignidad [Scheffner M, et al., 1992].

Está bien documentado que p53 tiene un papel crítico en la ejecución de la apoptosis [Donehower LA., 1994]. El primer indicio que p53 podía mediar la muerte celular surge de los experimentos realizados por Yonish-Rouach *et al.* (1991) que, al transfectar células de leucemia mieloide con una construcción que incluye p53 cuya conformación es sensible a temperatura, observó que solo a la temperatura a la cual se expresaba p53 las células se apoptotizaban. Un estudio de Shaw *et al.* (1992) demostraron que la introducción de p53 a células de cáncer de colon resultaba en apoptosis. A partir de entonces numerosos estudios

han demostrado que p53 puede inducir apoptosis en células de tumor así como en células normales. Sin embargo cabe mencionar que también se ha descrito una vía independiente de p53 donde células con p53 mutante son capaces de apoptotizar [Nuñez G and Clarke MF, 1994., Redd JC, 1994].



ESQUEMA 3

Figura 3. Activación del gen p53 después de un daño al DNA.

La proteína Bcl-2

Otro gen implicado en apoptosis es el gen que codifica para la proteína Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2). Se identificó por su papel en el desarrollo de linfoma folicular humano, en el que sufre una translocación cromosomal t(14:18) [Redd JC, 1994]. En esta translocación el gen de Bcl-2 se mueve de su posición normal en 18q21 a la posición 14q32 quedando en posición contigua al *locus* de la cadena pesada de inmunoglobulinas. Esta translocación da por resultado la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 de 26 Kda en las células de este tipo de tumores.

El producto del gen Bcl-2 funciona como señal anti-apoptótica, suprime la apoptosis inducida por diversos estímulos, incluyendo drogas quimioterapéuticas y radiación gama [Oliver FJ, et al., 1993., Hsu B, et al., 1994]. La proteína Bcl-2 fue el miembro fundador de una amplia familia de proteínas relacionadas con apoptosis, la cual incluye las proteínas codificadas por los genes de: bcl-xs y bax (ambos inducen apoptosis) y bcl-xL, mcl-1 y A1, que al igual que Bcl-2, inhiben la apoptosis. Esta familia de proteínas tienen en su extremo COOH una región hidrofóbica y dos regiones muy homólogas en su secuencia, las regiones denominadas BH1 y BH2 [Boise LH, et al., 1993].

Bcl-2 se expresa ampliamente en muchos tejidos fetales, si bien en el adulto es expresado principalmente en células que se dividen rápidamente y se diferencian en su componente maduro como son las células de las criptas del epitelio del intestino, o de la piel y en progenitores de células hematopoyéticas. La expresión de Bcl-2 declina en células maduras o en estados en los cuales van a ser eliminadas. Bcl-2 se expresa también en células de varios tipos de tumores, incluyendo

carcinoma de mama. Aunque Bcl-2 por si solo no estimula la proliferación o causa transformación, coopera con c-myc y miembros de la familia de ras para transformar células [Lam M, et al., 1994., Monaghan P, et, 1992]. Se ha demostrado que bcl-s protege a las células de la apoptosis inducida por c-myc y p53 [Haldar S et al., 1994].

La proteína Bcl-2 está asociada con membranas y se ha localizado en la mitocondria, retículo endoplásmico y en la región perinuclear. El mecanismo exacto por el cual Bcl-2 previene la apoptosis no es claro. Sin embargo, este gen ha sido implicado en la regulación de flujo de Ca^{2+} a través de la membrana del retículo endoplásmico, en el transporte nuclear, en la formación de poros nucleares, en el ensamblaje y en el mantenimiento de la envoltura nuclear [Krajewski S, et al., 1993]. Se ha demostrado que Bcl-2 se une a Bax y a R-ras. Se piensa que normalmente esta proteína homodimeriza formando un complejo funcional y cuando se une a Bax se inactiva. No se conocen las implicaciones funcionales de la unión de Bcl-2 con R-ras [Oltvai ZN, et al., 1993., Wang HG, et, 1994].

Se ha propuesto que Bcl-2 inhibe la apoptosis actuando como un antioxidante o inhibiendo la generación de radicales libres de oxígeno [65, 66]. En células hematopoyéticas apoptóticas la sobreexpresión de Bcl-2 se asocia con un decremento en daño celular por estrés oxidativo, si bien no se presenta una disminución en la formación de intermediarios de oxígeno reactivo [Fernandez-Sarabia MJ, and Bischoff JR, 1993]. Kane y colaboradores (1993) encontraron que Bcl-2 previene la apoptosis por decremento de la generación de especies oxígeno reactivas en células neuronales. Hockenbery et al. (1993), proponen que

la proteína Bcl-2 podría actuar por interacción proteína-proteína, en sitios generadores de ROI.

Experimentalmente se ha encontrado que existen múltiples inductores externos de la apoptosis, de tal forma que se puede inducir apoptosis con radiación, iónoforos de calcio, factor de necrosis tumoral, adición o falta de hormonas esteroides, y carencia de factores de crecimiento y citocinas [Earnshaw WC, 1995., Schwartzman R, and Cidlowski JA., 1993]. La habilidad de la célula de responder a señales extracelulares es esencial para la sobrevivencia y el desarrollo de los organismos. Existen sistemas de traducción que conectan las señales extracelulares con el núcleo para modular la expresión de genes específicos. Muchas de estas vías transmiten la señal a la maquinaria nuclear, activando factores de transcripción específicos que regulen la expresión de diversos genes con el fin de que la célula responda a los diversos estímulos. Para algunos estímulos se conoce la secuencia total de esta vía o vías de transducción de la señal; en el caso de la apoptosis, a pesar que los eventos finales morfológicos son muy similares en diversos tipos celulares y con diversos estímulos, no se ha podido encontrar una vía común; si bien, es posible que algún o algunos factores de transcripción sean comunes en los procesos apoptóticos [Lee S, Christakos S, and Small MB., 1993., Bowen ID., 1993].

El factor de transcripción AP-1 (Proteína Activa 1).

El factor de transcripción AP-1 es un complejo dimérico compuesto por diferentes miembros de la familia de fos y jun así como también miembros de la familia de proteínas ATC/CREB [Angel P and Karin M, 1991]. AP-1 se une a un grupo de secuencias consenso en el ADN

denominadas TREs (TPA responsive enhancer element) que regulan la transcripción de una variedad de genes virales y celulares [Meyer M, et al., 1993] (Figura 4).

AP-1 es inducido en respuesta a una variedad de factores de crecimiento y señales intracelulares mediadas por la protein cinasa C dependiente de Ca^{2+} /diacilglicerol, la protein cinasa A dependiente de AMPc y por aumento de la expresión de varios oncogenes semejantes a src, y ras, así como por estrés oxidativo [Meyer M, et al., 1993].

La inducción de AP-1 ha sido observada durante la apoptosis de células epiteliales de mama de ratón [Marti A, et al., 1994] y la expresión de fos y jun se inducen durante la apoptosis de células linfoides. Además el tratamiento de células con oligonucleótidos dirigidos contra fos y jun protegen a células linfoides de la apoptosis [Abbadie C, et al., 1993]. Todo esto hace pensar que AP-1 tiene un papel importante en la respuesta de apoptosis por lo menos en algunos modelos.

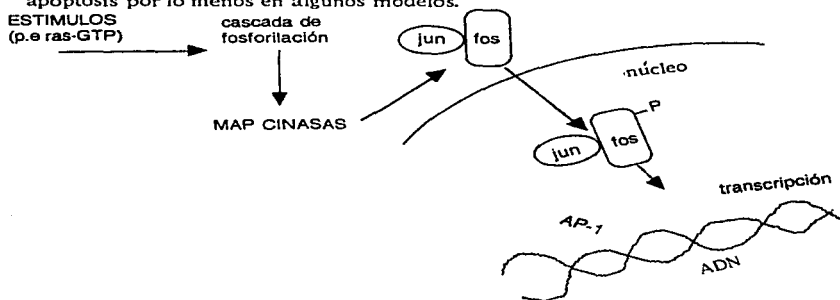


Figura 4. Activación del factor de transcripción AP-1.

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KB (factor nuclear del gen de cadena k de células B).

El factor de transcripción NF-kB es un activador pleiotrópico que participa en la regulación de genes específicos [Siebenlist U, et al., 1994]. NF-kB es un complejo dimérico compuesto de varias combinaciones de miembros de la familia de Rel/ NF-kB.

Esta familia de polipéptidos se distingue por la presencia del dominio homólogo a Rel (DHR), de aproximadamente 300 aminoácidos. Los miembros de la familia NF-kB pueden ser clasificados en dos clases: una agrupa a las proteínas precursoras de p105 y p100 las cuales son procesadas proteolíticamente a las formas maduras p50 y p52, respectivamente y el otro grupo agrupa a la familia de c-Rel, v-Rel, Rel A (p65) y Rel B, así como a la proteína dorsal de *Drosophila*; estas proteínas no son procesadas proteolíticamente. El complejo p50/Rel A (p50/p65) está presente en prácticamente todas las células y es usualmente el complejo más abundante [Siebenlist U, et al., 1994].

El complejo NF-kB se encuentra en el citoplasma como una forma inactiva unido a una proteína de la familia de proteínas relacionadas a Iκ-B. Después de una estimulación, IκB es fosforilado, ubiquinado y degradado proteolíticamente por proteosomas. El complejo NF-kB liberado se transloca al núcleo donde se une a sitios cis con secuencias consenso 5'-GGGpuNNpyPyCC3' en las regiones reguladoras de ciertos genes, regulando su transcripción [Grimm S and Baueverle PA, 1993., Rushlow C and Warrior R, 1992](Figura 5)

NF- κ B es activado por una variedad de estímulos, incluyendo esteroides de forbol, citocinas, luz ultravioleta, rayos gamma, proteínas virales y bacterianas, anticuerpos para receptores de superficie, lipopolisacáridos, ARN de doble hebra y síntesis proteica reducida [Siebenlist U, et al., 1994]. Muchos, si no todos, los estímulos que inducen a NF- κ B están relacionados a la generación de especies oxígeno reactivas que sirven como mensajeros comunes para su activación [Schreck R, et al., 1992a., Schmidt KN, et al., 1995].

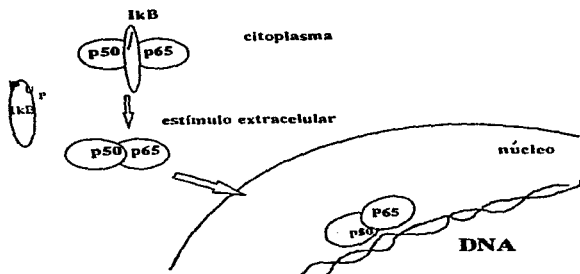


Figura 5 Activación del factor de transcripción NF- κ B.

Cisplatino

Diversas drogas antineoplásicas ejercen su efecto induciendo apoptosis. El cisplatino (cis-diaminedichloroplatinum (II) o CDDP) induce apoptosis en células de ovario, de leucemia murina, en células de hepatoma y en células de neuroblastoma [Barry MA, et al., 1990., Ormerod MG, et al., 1994]. El cisplatino es ampliamente usado en el tratamiento de carcinomas. Es una droga que se une al ADN forma varios tipos de aductos (monoadductos, enlaces cruzados intercatenarios e intracatenarios) y además forma enlaces cruzados entre ADN-proteínas y/o glutatión [Fichtinger-Schepman AMJ, et al. J, 1985] (Figura 6).

El mecanismo exacto de la acción del cisplatino no se ha elucidado todavía, si bien la inhibición de la síntesis de ADN fue considerada como crítica para su toxicidad. Esta idea fue corregida cuando Sorenson *et al.*, [Sorenson CS and Eastman A, 1988] demostraron que concentraciones bajas de cisplatino, que no inhiben la replicación, también causan muerte celular. Las células continúan ciclando hasta llegar a la fase G2 en la cual se detienen y después de un periodo de latencia las células mueren. Los niveles de síntesis de proteínas y ARN así como los niveles de ATP y NAD se mantienen normales. Cortes de doble hebra en el ADN se pueden detectar durante el periodo de latencia considerándose un marcador inicial de la muerte celular [Sorenson CS and Eastman A, 1988., Sorenson CM, et al., 1990]. Recientes datos de Masuda et al 1994, sugieren que el cisplatino genera especies oxígeno reactivas como aniones superóxido y radicales hidroxilo al interactuar con el ADN. La generación de especies reactivas puede jugar un papel en la citotoxicidad del cisplatino. Apoyando esos resultados Zhang et al 1995, reportaron que en cortes renales de rata, el cisplatino induce daño mitocondrial, depletando el

contenido de GSH y proteínas con grupo SH; también inhibe la toma de Ca^{2+} , colapsa el potencial mitocondrial y aumenta la peroxidación de lípidos

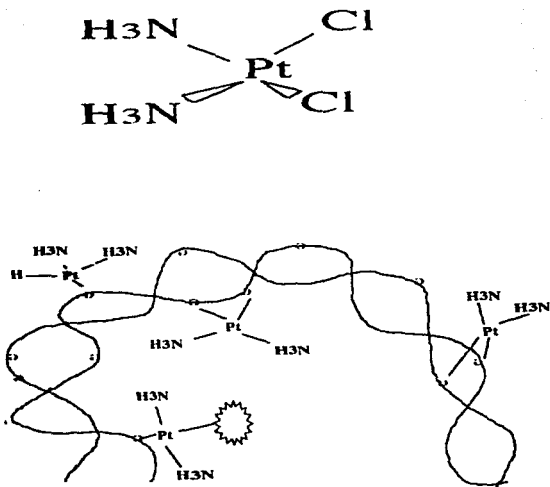


Figura 6. Estructura del cisplatino y su unión al ADN.

JUSTIFICACION

Con el fin de profundizar en los mecanismos mediante los cuales las drogas antineoplásicas ejercen su acción, iniciamos una serie de estudios encaminados a la elucidación de algunos eventos moleculares implicados en la acción del cisplatino en células HeLa. Los resultados de estos estudios nos ayudarán a profundizar en el proceso apoptótico inducido por agentes antineoplásicos así como establecer las bases para posteriores análisis sobre las causas de resistencia a drogas, señalar posibles marcadores tumorales de respuesta a quimioterapia, establecer posibles combinaciones de antineoplásicos y/o drogas adyuvantes y, en un futuro, diseñar estrategias para blancos celulares de nuevas drogas para el tratamiento del cáncer.

OBJETIVOS:

- **Determinar si el cisplatino induce apoptosis en células HeLa**
 1. Analizar si el cisplatino tiene efecto sobre la viabilidad celular en células HeLa
 2. Analizar si la exposición de células HeLa a cisplatino provoca cambios morfológicos y bioquímicos propios del proceso apoptótico
 - a) Determinar con técnicas histológicas la condensación de la cromatina en células HeLa expuestas a cisplatino.
 - b) Determinar la fragmentación de ADN *in situ* e *in vitro* en células HeLa expuestas a cisplatino.

- **Estudiar algunos eventos moleculares durante el proceso apoptótico en células HeLa inducido con cisplatino.**
 1. Analizar los niveles de actividad del factor de transcripción NF- κ B.
 2. Analizar los niveles de actividad del factor de transcripción AP-1
 3. Analizar la distribución subcelular de la proteína p53
 4. Analizar los niveles de la proteína Bcl-2.

MATERIALES Y METODOS.

Cultivo celular. Las células HeLa se crecieron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ (v/v) Las células se crecieron a 70 % de confluencia y entonces se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino (Sigma ST, Louis MO).

Análisis Histológico. Las células se fijaron en etanol al 70% durante 5 minutos a -20°C, se pretrataron con ARNsA (100ug/ml) durante 2 horas a 37°C, se tiñeron con el procedimiento de Feulgen, brevemente se incubaron las laminillas en una solución de ácido periódico al 0.5% durante 5 minutos, se lavaron en agua destilada, después se incubaron durante 20 minutos en el reactivo de Schiff y se lavan en agua corrie por 10 minutos, se contratiñeron con verde rápido y se incubaron por 5 minutos con bromuro de etidio (10mg/ml), y se lavaron con PBS varias veces. Las células se visualizaron en microscopio Zeiss, usando epifluorescencia para la tinción de bromuro de etidio y campo claro para la tinción de Feulgen, se fotografiaron con película Plus-X Kodak. La fragmentación del ADN fue detectado *in situ* por el método de TUNEL, el cual se basa en la habilidad de la transferasa terminal para incorporar nucleótidos unidos a digoxigenina en los extremos 3' libres del ADN y la detección de estos nucleótidos con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a peroxidasa [Gavrieli Y, et al., 1992]. Se visualizó y fotografió en campo claro como arriba se indica.

Viabilidad celular Se sembraron de 5 000 a 10 000 células por pozo en cajas de 96 pozos y se trataron con cisplatino o con el vehiculo (PBS). A diferentes tiempos se estimó la viabilidad con el ensayo de MTT

(3-(4,5-Dimethylthazol-2-yl)-2,5- dephenyltetrazolium bromide thiazolyl bleu), la cual es una sal amarilla soluble en agua que es procesada por las deshidrogenasas mitocondriales de células vivas y produce un compuesto púrpura, el cual se mide espectrofotométricamente [89]. Brevemente, se agregaron 10 µl de MTT (5mg/ml) por cada 100 µl de medio, se dejó incubar a 37°C durante cuatro horas, se les agregó 300 µl de etanol con HCl al 0.4 N y se midió la absorbancia a 570 nm con sustracción a 650 nm.

Análisis del ADN de bajo peso molecular. Aproximadamente 1×10^6 células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 250 µl de buffer de lisis (10 mM tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and 0.2% Tritón X-100) y se incubaron por 60 minutos a 50°C con 50 µg/ml de ARNasa y posteriormente 60 minutos a 37°C con 50 µg/ml de proteinasa K y se les agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN de alto peso molecular se eliminó con una pipeta pasteur. El ADN de bajo peso molecular se obtuvo por centrifugación a 10,000 x g durante 20 minutos. El botón se resuspendió en TE y se analizó por electroforesis convencional de agarosa al 0.8%. El gel se tiñó con bromuro de etidio (100 µg/ml) y se visualizó con luz ultravioleta.

Análisis del ADN de alto peso molecular. El ADN se aisló por el método de Walker (1992). Resumiendo: Las células se lisaron con SDS al 3% y los extractos de ADN se corrieron toda la noche en un gel de agarosa al 1 % con TAE a voltaje bajo (10 mV). Se lavó el gel con TE y tiñó con bromuro de etidio (100 µg/ml) para ser visualizado con luz ultravioleta

Inmunofluorescencia. Células HeLa se sembraron en cubreobjetos y se expusieron a cisplatino (40 μ M). Los cubreobjetos se recolectaron a varios tiempos después de la exposición. Para la detección de la proteína Bcl-2 las células se fijaron en acetona 80%, y PBS 20% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los cubreobjetos se hidrataron e incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-humano Bcl-2 (Dako-bcl-2-124) con una dilución 1:40 en PBS de Dulbecco con 3% de albúmina y se visualizó usando un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado con rodamina (Dako). Para la detección de la proteína p53 las células se fijaron en etanol a -20°C durante 10 minutos y se incubaron con un anticuerpo monoclonal pan-anti-p53 (clona Pab-122, Boehringer), se incubaron con un anticuerpo IgG anti-ratón (Dako) acoplado a rodamina. Se corrieron laminillas control sin el primer anticuerpo como control negativo. Las células se examinaron y se fotografiaron con un microscopio Olympus con epifluorescencia.

Análisis de proteínas por "Western blot". Los extractos celulares se prepararon por lisis con amortiguador de Laemmli [Laemmli UK, 1970]. Las proteínas se cuantificaron usando un micrométodo de Bradford modificado para extractos con altos niveles de sales y detergentes [Bradford MM, 1976 y Pande S V and Murthy MSR, 1994]. 100 μ g de proteína se separaron en un gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), y se transfirieron a membranas de nylon (Zeta-Probe). Después de bloquearlas con leche descremada se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 (Dako #124) se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario IgG-HRP en una dilución 1:300 (Amersham), el anticuerpo unido se detecto usando quimioluminiscencia (Boehringer Mannheim) con películas AR X-Omat (Kodak). Las proteínas fueron cuantificadas por densitometría.

Preparación de extractos celulares. Las células (2×10^7) incubadas con cisplatino se recolectaron por centrifugación a diferentes tiempos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 300 μ l del amortiguador A (10 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM $MgCl_2$, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF 2 μ g/ml leupeptina y 2 μ g/ml aprotinina). Después de incubar en hielo durante 15 minutos, se agregaron 25 μ l del detergente NP40 al 10%, las células se centrifugaron a 3000 x g. El sobrenadante se descartó y el botón nuclear se resuspendió en 100 μ l de amortiguador C (25 mM HEPES (pH 7.5), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM DTT, 0.1% NP40, 0.5 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptina y 2 μ g/ml aprotinina) [Frantz B, et al., 1994 y Zabel U, et al., 1991].

Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Para visualizar la unión de NF-kB al ADN, la reacción de unión se llevó a cabo en 20 μ l de volumen de amortiguador B (20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 20% glicerol, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1 mM DTT, 4 mM $MgCl_2$, 4 mM espermidina, 200 mM NaCl, 25 μ g/ml albúmina acetilada, 2 μ g poli(dI-dC) con 8 μ g de proteína nuclear, se incubó en hielo 15 minutos y se le agregó 100 pg de oligonucleótido de doble hebra marcado radiactivamente (100,000 cpm) y se incubó durante 30 minutos en hielo [Frantz B, et al., 1994]. Los complejos proteína-ADN se visualizaron por electroforesis en acrilamida al 5% [Maniatis T, et al., 1982]. Los geles se secaron al vacío y se expusieron a películas autorradiográficas a $-80^\circ C$ de 2 a 12 hrs y se cuantificaron por densitometría. Para visualizar el complejo AP-1-ADN la reacción de unión se realizó en amortiguador D (20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 20% glicerol, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1 mM DTT, 4 mM $MgCl_2$, 4

mM espermidina, 1 μ g poli (dI-dC) con 8 μ g de extracto nuclear. Se corrieron paralelamente reacciones de competición con oligonucleótidos no marcado en exceso (2,5, 25, 250 y 2500 M) así como con oligonucleótidos heterólogos y mutados con un exceso de 250 molar.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

kB: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'
3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCC-5'

AP-1 : -5'-GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGACTCAGCGG-3'
3'-CTAGGAAGCACTGAGTCGCCTAGGAAGCACTGAGTCGCC-3'

Las sondas fueron marcadas en extremo con [32 P] dATP (3000 Ci/mmol; Amersham) con la polinucleótido cinasa T4 (Boehringer Mannheim) usando procedimiento estándar.

RESULTADOS.

Análisis del efecto del cisplatino en células HeLa.

En una primera fase, se expusieron células HeLa a diferentes concentraciones de cisplatino (5, 10, 20, 40 y 80 μM), y se estimó la viabilidad con el ensayo de MTT (Figura 8). El cisplatino causó pérdida de la viabilidad de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al fármaco. Se decidió utilizar la concentración de 40 μM de cisplatino para los experimentos subsecuentes ya que es la concentración que se acerca a la utilizada en clínica y por los tiempos en los cual induce apoptosis que son relativamente cortos y permiten hacer los análisis con intervalos de tiempo maás cercanos.

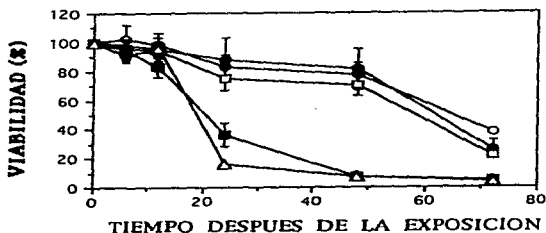


Figura 7. Viabilidad de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino durante un curso temporal. Las concentraciones usadas fueron: 5 μM (●), 10 μM (○), 20 μM (□), 40 μM (■), y 80 μM (△). Los datos son la media desviación estándar de tres experimentos. (Ver material y métodos).

Para saber si esta pérdida de viabilidad se debía a un proceso apoptótico se evaluaron diferentes parámetros. El primer criterio usado fue la detección de cambios morfológicos principalmente nucleares por examen citológica utilizando bromuro de etidio y la reacción de Feulgen. Las células con cromatina altamente condensada y núcleos fragmentados aparecen a las 15 horas después del inicio del tratamiento con cisplatino, y casi todas las células presentaron esta morfología a las 18 hrs. (Figura 8) Esta morfología es característica de las células apoptóticas como se describe anteriormente [Gerschenson LE, and Rotello RJ., 1992.].

El segundo criterio para detectar apoptosis fue la detección de fragmentación del ADN *in situ* con la técnica TUNEL. A las 18 horas después de exponer las células al cisplatino se detectaron células apoptóticas, las cuales no se presentaron en las células testigo. Los núcleos que se tiñeron positivos muestran típicamente morfología apoptótica. (Figura 8F).

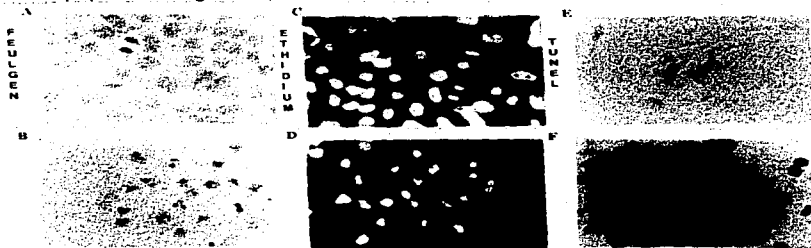


Figura 8. Apoptosis inducida con cisplatino en células HeLa. Paneles A, C, y E son células control; los paneles B, D y F son células expuestas a cisplatino 40 μ M durante 18 horas. Los paneles A y B son células con tinción de Feulgen. Los paneles C y D son núcleos teñidos con bromuro de etidio y los paneles E y F células sometidas a la técnica de TUNEL. (Ver material y métodos).

Posteriormente se analizó la fragmentación de ADN en geles de agarosa durante un curso temporal. Después de exponer las células HeLa a cisplatino ($40 \mu\text{M}$) se extrajo el ADN de bajo y de alto peso molecular a diferentes tiempos y se analizaron por electroforesis en agarosa. Como se muestra en la figura 9B la fragmentación de ADN de alto peso molecular aparece entre las 12 y 15 hrs después del tratamiento y una sustancial cantidad de ADN fragmentado en patrón de "ladder" de fragmentos discretos de cerca de 200 pb (Figura 9A). En contraste, ninguna fragmentación fue observada en células testigo. Esta fragmentación se observó a las 18 hrs postratamiento, fue reproducible y muy fugaz.

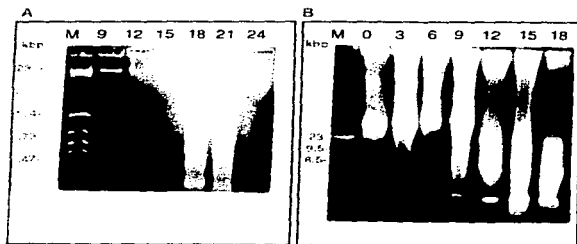


Figura 9. Electroforesis del DNA de células HeLa. El cuadro A muestra el DNA de alto peso molecular y el cuadro B es DNA de bajo peso molecular de células testigo ó expuestas a cisplatino $40 \mu\text{M}$ durante un curso temporal. En el carril M se corrió un marcador de peso molecular. (Ver material y métodos).

En la siguiente fase, se procedió a determinar la probable participación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1 así como la participación de las proteínas p53 y Bcl-2 durante la inducción de apoptosis en nuestro modelo.

Análisis de la actividad de factores de transcripción NF-kB y AP-1

Para determinar si el tratamiento con cisplatino (40 μ M) tenía algún efecto en la actividad de unión de los factores de transcripción NF-kB y AP-1, se hicieron ensayos de cambio de movilidad en gel con los extractos nucleares de las células testigo o de las tratadas con cisplatino a los tiempos indicados. Si bien los complejos específicos de AP-1 no se modificaron, la actividad de unión de NF-kB presentó un aumento significativo después de la exposición al cisplatino (Figura 9). Bajo nuestras condiciones experimentales se detectó un complejo principal, el cual aumentó durante el curso temporal, aproximadamente en 252 % a las seis horas, y en 290% a las 9 horas permaneciendo elevado hasta las 24 horas. Este complejo fue inducido en menor magnitud en células tratadas con peróxido. Después de una larga exposición de la película se detectó otro complejo que aumentó débilmente a las 12 horas después del tratamiento con el compuesto antineoplásico, aunque fue mayor que la obtenida con peróxido de hidrogeno.

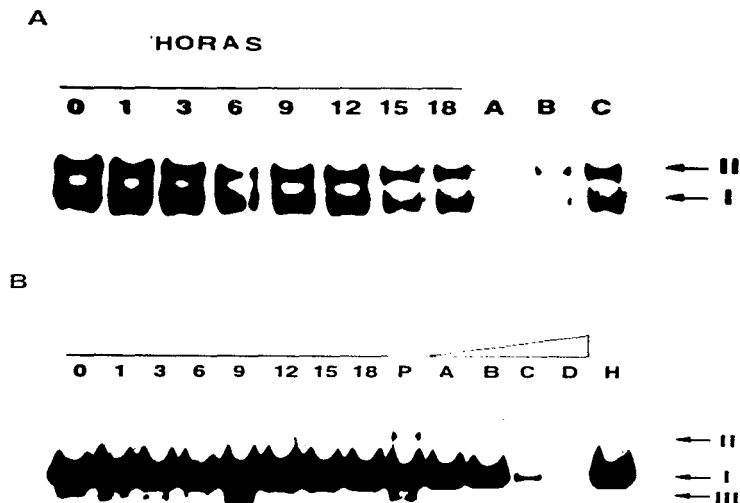


Figura 10 (A). Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 con extractos de células HeLa tratadas con cisplatino (40 μ M) durante un curso temporal (horas). El carril A representa competición con el oligo homólogo (AP-1) no marcado, el carril B competición con el oligo mutado no marcado, y el carril C competición con un oligo heterólogo (NF-kB). (B) Actividad de unión a DNA del factor de transcripción NF-kB con extractos de células HeLa tratadas con cisplatino (40 μ M) durante un curso temporal (horas). El carril A reacción con extractos de células tratadas con H_2O_2 . Los carriles B,C,D, y E son la competición con el oligo homólogo no marcado a diferentes concentraciones, 2,5,25,250,2500 M, respectivamente y el carril F es la competición con oligo heterólogo (AP-1).

Análisis de la distribución celular de p53

La proteína antioncogena p53 ha sido implicada en la apoptosis inducida por daño al ADN [Benveniste P and Cohen A, 1995. y Kuerbirtz S J, et al., 1993.] Ya que las células HeLa tienen muy bajos niveles de la proteína p53 por la degradación inducida por la proteína E6 de papilomavirus, puede ser posible que en estas células p53 no tenga un papel en la apoptosis. Este hecho es de particular importancia ya que la función de p53 es arrestar en la fase G1 del ciclo celular. Esta función se encuentra abolida en esta línea celular [Prives C and Manfredi JJ., 1993]. Por esta razón nosotros estudiamos la distribución celular de esta proteína por inmunofluorescencia. Como se muestra en la figura 10, la proteína p53 fue escasa y citoplasmica en las células control. Una clara redistribución ocurrió después del tratamiento a las 12 horas, cuando la mayoría de los núcleos mostraron una tinción positiva, sugiriendo que p53 escapa al control de E6.

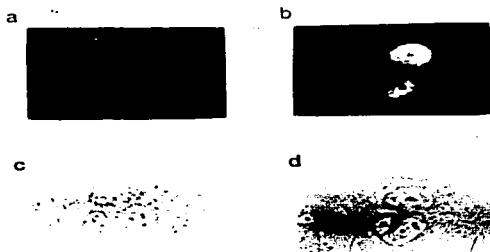


Figura 11. Expresión de la proteína p53 en células HeLa. a) células testigo (sin tratamiento), b) células tratadas con cisplatino (40 μ M) durante 12 horas. c y d) contraste de fases de las células a y b respectivamente.

Análisis de los niveles de la proteína Bcl-2

Bcl-2 disminuye su expresión en varios procesos apoptóticos (Haldar *et al.*, 1994, Redd, 1994). Ya que esta proteína puede ser regulada negativamente por p53, la redistribución de esta proteína a las 12 horas podría causar una disminución de Bcl-2. Como se muestra en la figura 11 aunque los niveles basales de Bcl-2 bajan después del tratamiento con cisplatino. La pérdida se inicia una hora después del tratamiento, siendo débilmente detectable a las 12 hrs previo a los cambios subcelulares de p53. Este decremento es también observado por inmunofluorescencia sin una aparente redistribución subcelular (Figura 11).

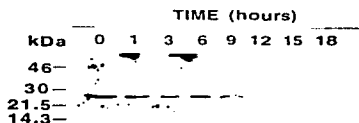


Figura 12 Niveles de Bcl-2 de células HeLa tratadas con cisplatino (40 μM) durante un curso temporal (horas)

DISCUSION

La exposición de células HeLa a diferentes concentraciones de cisplatino provocó una pérdida de viabilidad por inducción de apoptosis, como se comprobó a nivel morfológico con las tinciones específicas para ADN: la tinción de Feulgen y con bromuro de etidio, con las cuales se pudieron apreciar condensación y fragmentación de los núcleos.

Estas características se observaron con todas las concentraciones de cisplatino utilizadas, pero a diferentes tiempos. Con ninguna concentración se observó necrosis primaria y los experimentos fueron muy reproducibles.

Al hacer el análisis del ADN a nivel electroforético se encontró que a tiempos cortos, entre 9 y 12 horas se presentó una fragmentación de alto peso molecular del ADN y a las 18 horas se encontró una fragmentación de bajo peso molecular del ADN. Este es un resultado contrario a los reportes iniciales que mostraban que las células HeLa inducidas a apoptosis por otros estímulos solo presentan fragmentos de ADN de alto peso molecular, Tomei et al propusieron que esta línea celular carecía de una endonucleasa específica. En este trabajo se utilizó una técnica muy sensible lo cual puede explicar la detección de los fragmentos cortos de ADN. Además utilizando otros estímulos como la luz ultravioleta, quelantes, inhibidores de macromoléculas y otras drogas antineoplásicas como taxol y 5 fluorouracilo también detectamos fragmentos de bajo peso molecular en células HeLa por lo que al parecer no es un efecto exclusivo del cisplatino (datos no mostrados).

Por la aparición temporal de los fragmentos grandes unas horas antes de la aparición de los fragmentos cortos estos resultados apoyan la hipótesis que los primeros son precursores de los fragmentos cortos. Cabe mencionar que la fragmentación de ADN de bajo peso molecular apareció junto con la morfología apoptótica a las 18 horas después de exponer las células a 40 μM de cisplatino, aproximadamente cuando el ID se encontraba al 50% (tiempo en el cual la mitad de las células se mueren con determinada concentración del fármaco).

Una característica de estos fragmentos es que aparecen durante un tiempo muy corto (1 hora aproximadamente) y son muy lábiles., lo cual también puede explicar el que no hayan sido observadas anteriormente. No hay que excluir la posibilidad de que en los reportes anteriores el proceso apoptótico en células HeLa se haya llevado a cabo por una vía diferente en la cual no se presente la fragmentación de bajo peso molecular.

Ya que en general los eventos moleculares que dirigen a la apoptosis después de la exposición de agentes que dañan el ADN, no se conocen bien, nosotros decidimos analizar la participación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κB . Si bien la actividad de unión de AP-1 no se modificó durante el proceso apoptótico en células HeLa tratadas con cisplatino, si encontramos una modificación de la actividad de unión del NF- κB . Algunos reportes anteriores ya especulaban el que este factor pudiera tener papel importante en la apoptosis . Una variedad de señales que dirigen la activación de NF- κB también son señales que inducen apoptosis, por ejemplo TNF- α , ionóforos de calcio, luz ultravioleta, radiación ionizante (α y X), ácido okadáico, ceramida e interleucinas [Siebentist U, et al., 1994].

También el proceso apoptótico y la actividad de NF- κ B se asocian a la generación de estrés oxidativo. Varias líneas de evidencia sugieren que las especies de oxígeno reactivas son un común y crítico denominador para varias señales que activan NF- κ B. Esas conclusiones se basan en la inhibición de NF- κ B por una variedad de antioxidantes como la N-acetyl-L-cysteina, ditiocarbamatos, y derivados de la vitamina E [Schreck R, et al., 1992a]. Además, la exposición de células a varios radicales libres como el peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y superóxido, provocan un aumento de la actividad de unión de NF- κ B [Schreck R, et al., 1992b].

Se ha propuesto recientemente que las especies oxígeno reactivas tienen un papel central en el inicio de la apoptosis, ya que peróxidos y radicales libres altamente reactivos pueden inducir apoptosis y muchos agentes que activan la apoptosis producen estrés oxidativo. Muchos de los genes cuya expresión es controlada por NF- κ B son mensajeros relacionados con el proceso apoptótico. Algunos genes críticos inducidos por NF- κ B son c-myc, N)-sintetasa, activador de plasminógeno tipo urokinasa, interleucina 1B, TNF- α , y p53 [Siebenlist U, et al., 1994, Wu H and Lozano G., 1994]. Un aumento en la cantidad de Rel se correlaciona con la apoptosis en el desarrollo del embrión de pollo [Neiman PE, et al., 1991]. La expresión de ν -rel exógeno en linfocitos previene la inducción de apoptosis por radiación, ionóforos de calcio o dexametasona [Abbadie C, et al., 1993]. Es importante recordar que el cisplatino genera especies de oxígeno reactivas como es el superóxido y los radicales hidroxilo, al interactuar con el ADN [Masuda H, et al., 1994], así que es concebible que la generación de radicales pueda mediar, por lo menos en parte, la respuesta apoptótica por agentes que dañan el ADN. El aumento de

actividad de unión de NF-kB sugiere que este factor de transcripción pueda tener un papel en el proceso apoptótico (Figura 7). En este ensayo nosotros detectamos un complejo principal inducido nueve horas después de iniciado el tratamiento que permanece elevado hasta las 18 horas. Este aumento precede el cambio intracelular de p53 y la aparición de las características morfológicas y bioquímicas. El uso de neutralizantes de radicales libres puede dar un resultado definitivo sobre el papel de NF-kB durante la apoptosis, así como si también el aumento es común en otros sistemas.

La función normal de p53 ha mostrado ser crucial para la inducción de apoptosis en líneas celulares de tumor, en timocitos de ratón y células hematopoyéticas después de un daño al ADN [Masuda H, et al., 1994]. Esta proteína es capaz de inducir un arresto en el ciclo celular en respuesta al daño del ADN y si el daño no es reparado dirige a la célula hacia el proceso apoptótico [Nelson WG and Kastan MB., 1994], aunque también ha sido reportado una vía apoptótica independiente de p53 [Berges RR, Furuya Y, Remington L, English HF, Jacks T and Isaacs JT 1993., Strasser A, Harris AW, Jacks T and Cory S 1994]. Gujuluva y colaboradores (1994) reportaron que a diferencia de los queratinocitos orales normales, los queratinocitos inmortalizados con papilomavirus no acumularon la proteína p53 en el núcleo cuando fueron expuestos a agentes que dañan el ADN, como la luz ultravioleta. Dado a que las células HeLa contienen el gen del papilomavirus 18, que expresa la proteína E6 la cual dirige a p53 a una degradación [Mansur CP and Androphy EJ, 1993., Boshart M, et al., 1984., Schwarz E, et al., 1985], nosotros analizamos la proteína p53 por medio de inmunofluorescencia durante un curso temporal, para probar si en nuestro modelo existía una vía independiente de p53. Sorprendentemente encontramos que la

proteína p53 se redistribuía al núcleo después de 12 horas de haber iniciado el tratamiento, justo antes de que las cambios morfológicos y bioquímicos se presentaran y después de la activación de NF-kB. Desconocemos la manera en que p53 evade el control por E6 durante este proceso. Posiblemente p53 aumente su síntesis y/o los niveles de E6 disminuyan durante el proceso. Se sabe que p53 puede reprimir E6 cuando se sobreexpresa [Desaintes C. et al., 1995] realizando así una retroalimentación positiva cuando escapa del control de E6. Además, la activación de NF-kB que encontramos puede también estar relacionada, ya que p53 tiene una secuencia consenso en su gen para NF-kB [Schwarz E, et al.,1985]. Ya que la citotoxicidad del cisplatino está relacionada al arresto en la fase G2/M [Sorenson CM, et al., , 1990] es concebible que en este proceso p53 participe en el arresto en esta fase y no en la de G1, ya que recientemente ha sido reportado que p53 controla esta fase del ciclo en células M1 de leucemia mieloblástica [Sorenson CM, et al., , 1990].

Se determinó. los niveles de la proteína supresora de apoptosis Bcl-2 ya que datos recientes muestran que esta proteína puede bloquear la apoptosis inducida con p53 [Sorenson CM, et al., , 1990] y p53 puede disminuir la expresión de Bcl-2 [Miyashita T, et al., 1994]. Los niveles de la proteína Bcl-2 decrecen después del tratamiento con cisplatino, con una pérdida gradual que comienza una hora después de iniciado el tratamiento. A las doce horas, cuando p53 entra al núcleo, los niveles de Bcl-2 son apenas perceptibles (Figura 1B) Este decremento de los niveles de la proteína Bcl-2 empieza antes de que exista un cambio en la proteína p53, implicando que otros reguladores aparte de p53 están involucrados en la modulación de los niveles protéicos de Bcl-2, como ocurre en poblaciones neuronales incluyendo neuronas simpáticas, neuronas de la corteza olfatoria y otras regiones en el cerebro [Miyashita

T, et al., 1994]. A este respecto es importante mencionar que Bcl-2 tiene la habilidad de modular la función de p53 alterando el tráfico subcelular durante el ciclo celular [Ryan JJ, et al., 1993].

Por lo tanto, durante el proceso apoptótico inducido por cisplatino en células HeLa, aumenta la actividad de NF- κ B, un factor que responde a estrés oxidativo, se presenta un decremento muy temprano de Bcl-2 y p53 evade el control de E6 y se distribuye hacia el núcleo. La precisa relación entre estos eventos y la importancia de cada uno de ellos deberá ser establecido con análisis más profundos y directos.

CONCLUSIONES

La droga antineoplásica cisplatino produce apoptosis en células HeLa de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de la droga. Las primeras horas después del inicio del tratamiento con cisplatino (40 μ M) los niveles de la proteína Bcl-2 disminuyen, después se presenta un cambio en los niveles de actividad de unión de NF- κ B y una redistribución de la proteína p53 al núcleo a las doce horas. En este momento se inicia la fragmentación de ADN de alto peso molecular y a las 18 horas se presenta la fragmentación de ADN de bajo peso molecular, y la morfología apoptótica. (Figura 12).

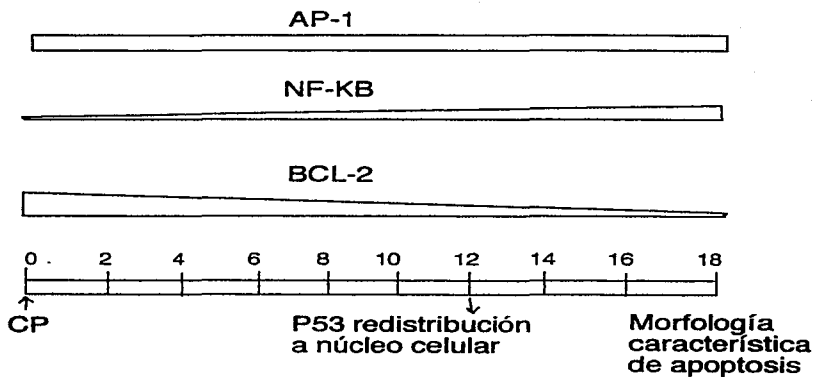


Figura 12. Modelo del comportamiento de los diferentes factores involucrados en el proceso apoptótico analizados en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA.

Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin, D, Vandebunder B and Enrietto PJ (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* 75: 899-912

Ameisen IC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A and Ouaiissi A. (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation*. 2: 285-300

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor W, and Stark GR. (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 92 :84-93-8497

Angel P and Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072: 129-157

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. (1990) Apoptosis : the role of the endonuclease . 136: 593-608.

Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C and Riabowol K. (1995) Increases activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 8348-8352

Barry MA, Behnke CA and Eastman A (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2353-2362

Benveniste P and Cohen A (1995). p53 expression is required for thymocyte apoptosis induced by adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8373-8377

Berges RR, Furuya Y, Remington L, English HF, Jacks T and Isaacs JT (1993) Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 8910-8914

Boise LH, González_García Maribel, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, and Thompson CB. (1993). bcl-x a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz W, Scheurlen W and Zur Hausen H. (1984) A new type of papillomavirus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical carcinoma. *EMBO J.* 3: 1151-1157

Bortner CD, Oldenburg NBE and Cidlowski JA. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *S:* 21-26.

Bowen ID. (1993) Apoptosis or programmed cell death ?. *Cell Biology International* 17: 365-380.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Brown DG, Sun XM, Cohen GM. (1993) Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol Chem.* 268: 3037-3039.

Buja, LM, Eigenbrodt ML and Eigenbrodt EH. (1993). Apoptosis and necrosis. *Arch pathol Lab Med.* 117: 1208-1214

Cohen JJ, Duke RC. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol* 132: 38-42.

Cohen GM, Sun X-M, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. (1994). Formation of large molecular weight fragment of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.* 153:507-516.

Compton MM. (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11: 105-109

Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. (1990). Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res.* 10:1153-1160.

Chiou S, Rao L, White E (1994) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2556-2563

Christensen ST, Wheatley DN, Rasmussen MI and Rasmussen L. (1995). Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death and Differentiation.* 2: 301-308.

Denizot F, and Lang R. (1986) *Immunol Methods* 89, 271-276.

Desaintes C, Hallez S, Detremmerie O and Burny A (1995) Wild type p53 down-regulates transcription from oncogenic human papillomavirus promoters through the epithelial specific enhancer. *Oncogene* 10: 2155-2161

Donehower LA. (1994) Tumor suppressor gene p53 and apoptosis. *The Cancer Bulletin.* 46: 161-166.

Dusenbury CE, Davis MA, Lawrence TS, Maybaum TS. (1991). Induction of megabase DNA fragments by 5-fluorodeoxyuridine in human colorectal tumor (HT29) cells. *Mol Pharmacol* 39:285-289

Earnshaw WC (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:337-343

Ellis RA, Yuan J, and Horvitz R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-6698.

EL-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer EW, Kinzer KW, and Vogelstein B. (1993) WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75: 817-825.

Ewen M.E. Miller S.J. 1996. p53 and translational control. *Biochem Biophys Acta* 1242:181-184.

Fernandez-Sarabia MJ, and Bischoff JR. (1993) Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 366: 274-276.

Fichtinger-Schepman AMJ, van der Veer JL, den Hartog JHJ, Lohman PHM and Reedijk J (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24: 707-713

Finlay CA. (1993) The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular and Cellular Biology* Jan:301-306.

Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF- κ B. *EMBO J.* 13: 861-870

Frebourg T and Friend SH. 1992 Cancer risk from germline p53 mutations. *J. Clin Invest* 90:1637-1641.

Friedman P, Kern S, Volgestein B, Prives C. (1990) Wild-type, but not mutant human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1990 87: 9275-9279.

Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson A. 1992. identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493-501.

Gerschenson LE, and Rotello RJ. (1992). Apoptosis : a different type of cell death. *FASEB Journal.* : 2450-2455..

Grimm S and Bauverle PA (1993) The inducible transcription factor NF- κ B: structure relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 290, 297-308

Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Horrmann B and Liebermann DA (1995) p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 10: 2263-2270

Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Horrman B and Liebermann DA (1995) p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 10: 2263-2270

Gujuluva CN, Baek JH, Shin KH, Cherrick HM and Park NH (1994) Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene* 9: 1819-1827

Haecker G and Vaux DL (1994) Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends Biochem. Sc.* 19: 99-100

Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S and Croce CM (1994) Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 54: 2095-2097

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 74: 241-251

Hsu B, Marin MC, Brisbay S, McConnell K and McDonnell TJ (1994) Expression of bcl-2 gene confers multidrug resistance to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Bull.* 46: 125-129

Huibregtse JM, Scheffner and Howley PM (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13: 775-784

Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahh H, Butler E, Selverstone J, Ord T and Bredesen DE (1993) Bcl-2 inhibition of Neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277

Kaufman SH. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49: 5870-5878.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26. 239-257.

Kerr JRF. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. (1994) *Cancer* 73: 2013-26.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, and Volgestein B. 1991. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, 252:1708-1711.

Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, and Vogelstein B (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256: 827-830

Krajewski S, Tanaka S, Takayama MJ, Schibler MJ, Fenton W, and Reed JC. (1993) Investigations of the subcellular distribution of the BCL-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53:4701-4714.

Kuerbirtz S J, Plunkett B S, Wals W V, and Kastan M B (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 7491-7495

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680-685

Lam M, Dubyak G, Chen L, Nuñez G, Miesfeld RL and Distelhorst CW (1994) Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6569-6573

Lee S, Christakos S, and Small MB. (1993) Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Current Opinion in cell Biology* 6: 286-291

Levine AJJ, Momand J and Finlay A. 1991. The p53 tumor suppressor gene. *Nature (lond)* 351: 453-456.

Lieberman DA, Hoffman B, and Steiman A. 1995. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependt and independent pathways. *Oncogene* 11:199:210

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE (1993) p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967

Maniatis T, Fritsch EF And Sambrook J (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Mansur CP and Androphy EJ (1993) Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. 1993. *Biochim. Biophys. Acta.* 1155: 323-345

Martin J. (1993) Apoptosis: suicide, execution or murder? *T cell Biol.* 3: 141-144.

Marti A, Jehn B, Costello E, Keon N, Ke G, Martin F and Jaggi R (1994) Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/Jun D) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 9: 1213-1223

Masuda H, Tanaka T, Takahama U (1994) Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:1175-1180.

Meyn RE, Milas L, and Stephens C. (1994) Programmed cell death in normal development and disease. *The cancer Bulletin* 46: 120124.

Meyer M, Schreck R and Baeuerle PA (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12:2005-2015.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805

Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, and Greaves MF. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem Cytochem.* 40, 1819-1825.

- Neiman PE, Thomas SJ and Loring G (1991) Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5857-5861
- Nelson WG and Kastan MB (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1815-1823
- Nuñez G and Clarke MF (1994) The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell. Biol.* 4: 399-403
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Walkeling AE, Walker PR, Sikorska M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 Kd fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3684
- Oliver FJ, Marvel J, Collins MKL and López-Rivas A (1993) Bcl-2 oncogene protects a bone marrow-derived pre-B cell line from 5'-fluor, 2'-doxyuridine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1: 126-132
- Oltvai ZN, Millman CL, and Korsmeyer SJ. (1993) BCL-2 Heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74: 609-619.
- Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D and Harrap KR (1994) Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp. Cell. Res.* 211: 231-237
- Pande S V and Murthy MSR (1994) A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 220: 424-426
- Prives C and Manfredi JJ (1993) The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev.* 7: 529-534
- Raff MC. (1992), Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 356:397-400
- Redd JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124: 1-6

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Ryan JJ, Danish R, Gottlieb C A and Clarke MF (1993) Cell cycle analysis of p53 induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 13:711-719.

Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, Nuñez G and Clarke MF (1994) c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5878-5882

Rushlow C and Warrior R (1992) The rel family of proteins. *BioEssays* 14: 89-95

Schulze-Osthoff K, Walczek H, Droge W, Krammer PH (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. cell Biol* 127:15-20.

Scheffner M, Werness, JM, Huibregtse JM, Levine AJ, and Howley PM. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.

Scheffner M, Takahashi JM, Huilbertse JD, Minna JD and Howley (1992) Interaction of the human papillomavirus type 19 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J. Virol.* 66:5100-5105.

Schreck R, Aldermann K, Baeuerle (1992a) NF- κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radical Res. Commun.* 17: 221-237.

Schreck R, Meier B, Maennel DN, Droge W, Baeuerle A (1992b) Dithiocarbamates as potent inhibitor of nuclear factor κ B activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10:2247-2258

Schmidt KN, Amstad P, Cerutte P and Baeuerle PA (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chem. Biol.* 2: 13-22.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A and zur Hausen H (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (Lond)* 314.111-114

Schwartzman R, and Cidlowski JA. (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* 14: 133-123

Selvakumaran M, Lin H_K, Miyashita T, Wang H-G, Krajewski S, Redd JC, Hoffman B, and Liebermann D. (1994) Immediate early up-regulation by p53 but not TGFB1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9:1791-1798.

Shaw P, Boverly R, Tardy, et al. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4495-4499.

Strasser A, Harris AW, Jacks T and Cory S (1994) DNA Damage can induce Apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2 *Cell* 79: 329-339

Siebenlist U, Franzoso G and Brown (1994) Structure, regulation and function of NF-kB. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10:4055-455

Sorenson CS and Eastman A (1988) Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity:role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 48: 4484-4488

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

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

Sun X-M, Cohen GM. (1994) Mg2+-dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *J. Biol Chem.* 269: 14857-14860.

Tomei, L.D., Shapiro, J.P. and Cope, F.O. (1993) Apoptosis in C3H-10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for intranucleosomal DNA modification in the absence of double strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 853-857

Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA, Meyers J: (1992) Genome digestion is a dispensable consequence of

physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 12:3060-3060

Walker, P.R., Kokileva, L., LeBlanc, J. and Sikorska, M. (1993) Detection of the initial stages of DNA fragmentation in Apoptosis. *Biotechniques* 15, 1032-1040

Walker PR, Pandey S, Sikorska M. Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation*. vol. 2 1995. 97-104.

Wang HG, Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, Hovey L, Troppmair J, Rapp UR, and Reed JC. (1994) Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9: 2751-2756

Williams GT. Programed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65:1097-1098

Wyllie AH, Kerr JRF, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis *Int Rev Cytol* 68: 251-305

Wu H and Lozano G (1994) NF-kB activation of p53. *J. Biol. Chem.* 31: 20067-20074.

Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. (1980) *Nature* 284, 555-556

Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG. (1992) The apoptosis endonuclease and its regulation. *IMMunology*. 4: 389-397.

Wyllie AH (1992) Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer*. 67: 205-208

Yuan J, and Horovotz HR. (1990) The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act autonomously to cause programmed cell death. *Devel Biol*. 138: 33-41.

Yonish-rouach E, Reznitzky D, Lotem J et al. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-347.

Zhang J-G and Lindup EW (1995) Cisplatin-Nephrotoxicity: decreases in mitochondria protein sulphhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1127-1135

Zabel U, Schreck R and Baeuerle PA (1991). DNA Binding of purified transcription factor NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 266;252-260.