UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

178

" LA CERAMIDA COMO SEGUNDO MENSAJERO DEL EFECTO CITOTOXICO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL: POSIBLE PARTICIPACION DE UNA PROTEINA FOSFATASA 2A ACTIVADA POR CERAMIDA Y SENSIBLE A ACIDO OKADAICO "

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA:

Biol. María de Jesús Ibarra Sánchez.

Director de Tesis:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

1997

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de CONACyT

A mis padres:

Les dedico el presente trabajo con profundo amor, admiración y respeto por todo el apoyo que me han dado toda mi vida para lograr mis objetivos.

Gracias por haberme dado lo más bello, la vida y su amor incalculable.

Gracias por sus consejos y enseñanzas que me han servido de guía en esta vida.

Gracias por comprender todas mis locuras y compartir conmigo los momentos más bellos y los más difíciles de mi vida.

Beco

You were my strength when I was weak.
You have been my inspiration when I was falling.
Through the lies you were the truth.
My world is a better place because of you.
I'm everything I am because you gave me faith.
Thanks for being my everlasting inspiration.

A Magdalena:

Por darme su amistad y cariño; por estar conmigo en las alegrías y los momentos difíciles que he pasado.

A Leticia Rocha:

Por su amistad, comprensión y sus valiosos consejos.

A Rosa Isela:

Por compartir uno de mis más grandes ideales, por haber cruzado conmigo todo el continente y haber compartido conmigo esos momentos tan emocionantes.

Dios me da la fuerza.

Cuando todo en la vida me parecía obscuro, cuando ninguna luz me indicaba el camino a seguir. Dios ha sido mi refugio, me dió la oportunidad de seguir adelante en busca de la fuerza y la motivación perdida.

PEGADAS NA AREIA

Una noite tuve un sonho...
Sonhei que estava na praia com o Senhor e, através do céu,
passavam cenas da minha vida! Para cada cena que passva,
percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós,
olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que,
muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um
par de pegadas na areia. Noite, também, que isso aconteceu
nos momentos mais dificeis e angustiantes da minha vida.

Isso aborreceu-me, deveras. Preguntei, entao, ao Senhor:
" Senhor, tu me disseste que, uma vez que eu resolvi te seguir, tu
andarias sempre comigo, todo o caminho, mas
noite que, durante as maiores tribulaçoes de meu viver
havia, na areia dos caminhos de minha vida, apenas um
par de pegadas. Nao compreendo porque, nas horas
em que eu mais
precisava de ti, tu me deixaste. "

O Senhor me respondeu:

" Meu precioso filho: eu te amo e jamais te deixaria nas horas
de tu prova e do teu sofrimento! "
" Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi
exactamente aí que eu te carreguei nos braços. "

Deseo agradecer al Dr. Alejandro Zentella Dehesa su paciencia, su dedicación y sus valiosas enseñanzas, las cuales culminan en el presente trabajo.

Agradezco a los integrantes de mi comité tutorial y miembros del jurado por sus valiosos comentarios.
Dra. Rosario Muñoz Clares
Dra. Marietta Tuena S.
Dr. Enrique Piña
Dr. Guillermo Alfaro
Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz
Dr. Jorge Vázquez R.

Agradezco a la Sra. Rocio Camarillo, su valiosa asistencia técnica.

INDICE

Abreviaturas 1
Resumen 4
Introducción
I. Factor de necrosis tumoral
Estructura, inducción y producción 5
Actividad biológica 5
Actividad biológica *in vivo* 6
Apoptosis 7
Receptores de TNF 9
Señales de transducción inducidas por TNF 11
Unión de proteínas acopladoras al receptor de TNF 13
Activación de cisteil-proteasas 14
Activación de porteína cinasa C 15
Activación de fosfolipasa A_2 15
Activación de esfingomielinasas 15
Activación de proteína cinasa dependiente de ceramida. 16
Activación de proteína fosfatasa dependiente de ceramida 17
II. Ceramida como segundo mensajero 18
Generalidades de esfingolípidos 19
Metabolismo de ceramida 20
Efectos biológicos de la ceramida 22
Efecto sobre la proliferación y diferenciación 23
Apoptosis 23
Inflamación 23
Eventos bioquímicos posteriores a la ceramida 24
Justificación 25
Objetivos 26
Materiales y método 27
Resultados 30
Discusión 44
Conclusiones y perspectivas 53
Bibliografía 54
Apéndices 66

ABREVIATURAS

FACTORES Y PROTEINAS

AA	Acido araquidónico
CAPK	Proteína cinasa dependiente de ceramida
CAPP	Proteína fosfatasa dependiente de ceramida
CD40	Antígeno de linfocitos B
CER	Ceramida
DAG	Diacilglicerol
DNA	Acido desoxiribonucleico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
ELAM-1	Molécula de adhesión leucocito-endotelial-1
ERK2	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte del antígeno FAS
FAN	Factor asociado a la activación de la esfingomielinasa neutra
FAS	Antígeno de superficie de fibroblastos
FLICE	Proteína homóloga de FADD y de ICE
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
ICE	Enzima convertidora de IL-1β
IFN-γ	Interferón-γ
IκB	Inhibidor del factor de transcripción nuclear de la cadena κ de anticuerpos producidos por células B
IL-1β	Interleucina-1β
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
JNK	Proteína cinasa nuclear de Jun
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína cinasa cinasa de MAPK
MEKK	Proteína cinasa de MEK

NF-κB	Factor de transcripción nuclear de la cadena κ de anticuerpos producidos por células B
NGF	Factor de crecimiento neural
OX40	Antígeno de linfocitos T
PARP	Poli (ADP ribosa) polimerasa
PGE_2	Prostaglandina E_2
PKC-ζ	Proteína cinasa C-ζ
PLA_2	Fosfolipasa A_2
RIP	Proteína que interactúa con el receptor tipo 2 del factor de necrosis tumoral
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
SEK	Proteína cinasa cinasa activada por estrés
SM	Esfingomielina
SMA	Esfingomielinasa ácida
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor de TNF tipo 1
TNFR2	Receptor de TNF tipo 2
TRADD	Proteína asociada al dominio de muerte de TNFR1
TRAF2	Factor asociado al receptor 2

COMPUESTOS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AO	Acido okadaico
ATP	Trifosfato de adenosina
GTP	Trifosfato de guanina
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
MTT	Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiasol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

LINEAS CELULARES

L929-P6 Clona sensible a TNF y puromicina proveniente de la línea celular L929 proveniente de pulmón de ratón.

L929-CR1 Clona sensible a TNF proveniente de la línea celular L929 proveniente de pulmón de ratón.

L929-D.3 Clona transfectada con el cDNA de Bcl-2, resistente parcialmente al efecto citotóxico de TNF, proveniente de la clona L929-P6.

L929-EE19 Clona resistente a TNF y sensible a ceramida, obtenida por mutagénesis química, proveniente de la clona L929-CR1.

RESUMEN

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un polipéptido producido principalmente por macrófagos activados, descrito inicialmente por su capacidad de producir necrosis en tumores; sin embargo, su valor terapéutico en el tratamiento del cáncer ha sido limitado, ya que en dosis altas resulta muy tóxico para el organismo. *In vitro*, el TNF produce muerte por apoptosis en varias líneas celulares transformadas y en la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L929. Este tipo de muerte celular es un proceso altamente regulado, que es desencadenado y controlado por señales solubles mediadas a través de receptores específicos. En el caso del TNF, el programa de muerte se enciende por la unión a sus receptores específicos sobre la superficie de la célula, p55 (TNFR 1) y p75 (TNFR2).

En los últimos años se ha involucrado al metabolismo de los esfingolípidos y en especial a la ceramida, como posible mediador intracelular de los efectos producidos por el TNF y otros factores solubles como la interleucina-1β y el interferón-γ. Por una parte, se ha reportado que el TNF estimula la producción de ceramida en ciertas líneas celulares de origen hematopoyético. Por otra parte, se ha demostrado que análogos sintéticos de la ceramida, inducen la degradación internucleosomal del DNA y muerte celular en estas mismas líneas celulares.

En el presente trabajo se demostró que en las clonas L929-P6 y L929-CR1, sensibles a TNF, la adición exógena de C2, C6, C8-ceramida o de esfingomielinasa pueden producir una muerte similar a la inducida por TNF. En comparación, la C2-dihidroceramida, (forma de la C2-ceramida que carece del doble enlace 4-5 trans en la base esfingoide) tuvo una actividad citotóxica reducida. Por otro lado, en la clona L929-CR1, el tratamiento con TNF produce un incremento en los niveles basales de la ceramida después de 16 hrs de tratamiento; mientras que la clona resistente al TNF, L929-EE29 resultó sensible al efecto citotóxico de los análogos de ceramida. Cuando a esta clona se le trata con TNF no hay un aumento en los niveles endógenos de ceramida. También se pudo interferir con la muerte inducida por el TNF o por la C6-ceramida mediante la utilización de ácido okadaico, un inhibidor de proteínas fosfatasas, lo que demuestra de manera indirecta la participación de una proteína fosfatasa posiblemente del tipo 2A en la señal citotóxica desencadenada tanto por TNF como por ceramida. Todos estos resultados en su conjunto apoyan la hipótesis de que el ciclo de la esfingomielina participa en la señal citotóxica desencadenada por el TNF en células L929 y que la ceramida o alguno de sus metabolitos puede ser el segundo mensajero en el programa de muerte.

INTRODUCCION

1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

ESTRUCTURA, INDUCCION Y PRODUCCION

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un polipéptido de 157 aminoácidos con un peso aproximado de 17kDa, que fue aislado a homogeneidad como una glicoproteína a partir de medio condicionado de la línea celular promielocítica HL-60, la cual había sido previamente tratada con ésteres de forbol (1-5). Su estructura primaria fue determinada a partir de la proteína pura y la secuencia obtenida es idéntica a la que predice la secuencia de nucleótidos del RNAm (6). Se ha encontrado una forma de TNF de 26 kDa unido a la membrana plasmática, este pre-TNF posee una secuencia de 76 residuos de aminoácidos altamente hidrofóbicos, lo que sugiere que esta secuencia señal le sirve al TNF para insertarse en la membrana y posteriormente ser liberado en su forma de 17kDa por la activación de una proteasa localizada en la cara externa de la membrana plasmática (7).

En su forma activa el TNF es un homotrímero de aproximadamente 45 kDa y cada subunidad tiene un peso de 17 kDa. Estudios cristalográficos han corroborado su naturaleza trimérica, la cual resulta de un arreglo de cadenas en dos β-plegadas antiparalelas. El TNF es muy sensible a la actividad de proteasas, perdiendo su actividad biológica rápidamente, lo que sugiere una estructura terciaria poco compacta (8-10).

El TNF es producido principalmente por macrófagos activados, aunque también puede ser secretado por células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer), células linfoblásticas B, astrocitos, células de la granulosa y ciertos tipos de tumores de ovario y mama (4, 5, 11). La producción *in vivo* de TNF es desencadenada por una amplia variedad de agentes, entre los que se encuentran los lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas, virus, protozoarios, mitógenos, algunas citocinas, células tumorales y ésteres de forbol (12).

ACTIVIDAD BIOLOGICA

El TNF fue originalmente descrito como el principio activo presente en el suero de animales infectados con bacterias gram-negativas que producía necrosis en tumores. Se encontró que posee actividad citostática y citotóxica en diversas clases de tumores murinos, pero era incapaz de producir citotoxicidad o inhibición de la proliferación en fibroblastos embrionarios normales (13).

Actividad biológica *in vivo*.

En los últimos años se ha hecho evidente que la actividad biológica de TNF, *in vivo*, no está restringida a una actividad antitumoral, sino que juega un papel central en los distintos procesos de proliferación y diferenciación de células de origen hematopoyético. El TNF es capaz de modular la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, la inducción de moléculas de adhesión celular como ICAM-1, la inducción de inhibidores enzimáticos, y puede servir como inductor de la diferenciación celular (14-17). Por otra parte, el TNF tiene un amplio rango de efectos sobre células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas y ha sido implicado como mediador en la fisiopatología de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y alteraciones reumáticas (18). Además, es mediador de la diferenciación de células de origen hematopoyético, de la reabsorción de la médula ósea y de la angiogénesis *in vitro* (19-22). La inyección intravenosa o intraperitoneal de TNF en ratas, ratones y mandriles, ha sugerido que se encuentra involucrado en la caquexia, la anemia, la hipercalcemia, la metástasis tumoral y el choque séptico (23-25). Por tanto, el TNF es un importante mediador endógeno de las alteraciones causadas por agentes infecciosos. El valor terapéutico del TNF en el tratamiento del cáncer es limitado debido a sus efectos tóxicos al organismo al ser administrado en dosis altas ($\mu g/m^2$), además de la amplia variación en la sensibilidad de los tumores al efecto citotóxico de TNF. En algunos casos, el TNF sólo ejerce un efecto citostático y en otros no tiene ningún efecto (26). Dependiendo del tipo celular y de la presencia de inhibidores metabólicos, el TNF puede inducir muerte celular apoptótica o necrótica (27) (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos biológicos de TNF.

Célula blanco	*Efectos*
Tumores murinos [a]	Necrosis hemorrágica
Células endoteliales [b]	Inhibe proliferación, produce angiogénesis *in vitro*, activa al factor de transcripción NF-κB, estimula la producción de GM-CSF e IL-1, induce la expresión de HLA, ICAM-1, ELAM-1, suprime la proteín cinasa C activada.
Líneas celulares (L-929) y tumorales (MCF-7, HL-60, ME 180, U937). [b]	Citotoxicidad, inhibición de la proliferación.
Leucemia mieloide aguda (LMA) [b]	Modulación de diferenciación al linaje monocito-macrófago.
Adipocitos y mioblastos [b]	Represión de la diferenciación, represión génica.
Neutrófilos y macrófagos [b]	Quimioatrayente.
Fibroblastos diploides normales [b]	Estimula proliferación.

a: efecto *in vivo*; b: efectos *in vitro*

Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular altamente regulado. Al igual que la proliferación y la diferenciación celular, la apoptosis es controlada por señales solubles mediadas a través de receptores, que pueden ser tanto hormonas como diversas citocinas entre las que se encuentra el TNF. Los mecanismos de control celular mediados por receptores desencadenan señales intracelulares, que incluye la liberación de segundos mensajeros y activación de proteínas cinasas y fosfatasas (28).

Los cambios bioquímicos y morfológicos de la apoptosis incluyen una disminución en el volumen celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación internucleosomal del DNA. Estos cambios distinguen a este proceso apoptótico de la muerte necrótica. La fragmentación internucleosomal del DNA ha sido considerada como el marcador bioquímico típico de la apoptosis, en contraposición a lo que ocurre durante la muerte celular por necrosis. Esta fragmentación internucleosomal del DNA parece ocurrir siempre en células de origen hematopoyético, mientras que en células de origen no hematopoyético no siempre se observa (29-31).

La muerte celular programada ocurre en la mayoría de los tejidos animales para eliminar células peligrosas o aquellas que se están produciendo en exceso. Durante el desarrollo embriológico muchas células están destinadas a morir. En la selección de neuronas funcionales la muerte celular programada juega un papel muy importante. También la autotolerancia inmune se establece al eliminar a las células autoreactivas. Algunas células inmunes efectoras matan a células infectadas por virus o células cancerosas por medio de una muerte apoptótica y se ha postulado que la actividad biológica de TNF participa en este tipo de selección celular. La importancia de la muerte por apoptosis *in vivo* se refleja en que la prevención de la apoptosis puede causar una transformación neoplásica (32-33).

Por medio de un análisis genético de varias mutantes de la vía apoptótica en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado varios genes cuya expresión regula el proceso de muerte (34-35). Mutaciones en los genes *ced-3* y *ced-4* previenen la apoptosis; mientras la mutación de *ced-9* provoca un incremento en la muerte, indicando que *ced-3* y *ced-4* son reguladores positivos de la apoptosis, mientras que el producto de *ced-9* inhibe el proceso (36-37). La clonación de *ced-3* y *ced-9* ha demostrado que son homólogos a los genes humanos ICE (del inglés: interleukin-1β converting enzyme) y Bcl-2 (del inglés: B cell leukemia gen 2) respectivamente. Si bien la participación de los productos de estos dos genes en la muerte celular programada ha sido demostrada, aún no está bien

definido el mecanismo por el cual se regula la expresión y activación de estos productos génicos en la apoptosis (38-39).

El proto-oncogen *bcl-2* fue descubierto como una translocación cromosómica presente en linfomas B foliculares humanos, cuyo producto génico ha sido involucrado como un supresor de la apoptosis (40-43). Bcl-2 es una proteína integral de membrana de 25 kDa que contiene un segmento hidrofóbico sencillo de 19 residuos de aminoácidos, el cual esta localizado hacia su extremo carboxilo terminal, y que media la interacción de la proteína con las membranas. Esta proteína se ha encontrado principalmente en la mitocondria, además del retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. La capacidad de Bcl-2 de inhibir la apoptosis disminuye en construcciones proteicas que han perdido su extremo carboxilo terminal (44-48). Sin embargo, el mecanismo por el cual Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis aún no ha sido completamente descubierto.

Si bien el mecanismo efector por el cual se lleva a cabo la muerte celular aún no es completamente conocido, recientemente se ha involucrado en la activación una cascada de cisteil-proteasas como el principal mecanismo efector de la apoptosis. La sobreexpresión en fibroblastos de este tipo de proteasas, como ICE, induce una muerte celular similar a la apoptosis, lo que ha puesto de manifiesto la importante función que desempeñan las proteasas en la maquinaria de muerte (49). Estudios posteriores han llevado al descubrimiento de siete homólogos de Ice/Ced3, Nedd-2/Ich-1 (50-51) CPP32/Yama/Apopaina (52-54) Tx/Ich-2/Ice rel-II (55-57), Ice rel-III (57), Mch-2 (58), ICE-LAP3/Mch-3/CMH-1 (59-61) y ICE-LAP6 (62). Todas estas proteasas comparten una secuencia de cinco residuos de aminoácidos altamente conservada, alrededor de un sitio de cisteinas. Las sobreexpresión de todas estas proteasas también induce muerte celular de manera similar a ICE.

La actividad de las proteasas es altamente regulada por inhibidores endógenos de estas enzimas. Uno de los principales inhibidores encontrados es la serpina de origen viral, crmA, la cual previene la muerte inducida tanto por TNF como por el antígeno FAS en una gran variedad de líneas celulares (54-63). La inhibición de las proteasas por pequeños péptidos no solo se limita a las serpinas virales. Otras serpinas como el inhibidor del activador del plasminógeno 2 también es capaz de inhibir la muerte inducida por TNF (64). La utilización de estos inhibidores ha sido limitada debido a su falta de especificidad. Inicialmente se pensó que crmA era específico de ICE, pero se ha demostrado que también es capaz de inhibir a los homólogos de ICE.

Uno de los blancos proteicos que son degradados durante la apoptosis por estas proteasas es la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), la cual es una enzima nuclear abundante, que cataliza la conversión del dinucleótido NAD^+ en nicotinamida y en ADP-ribosa, unidas a proteínas (65). El

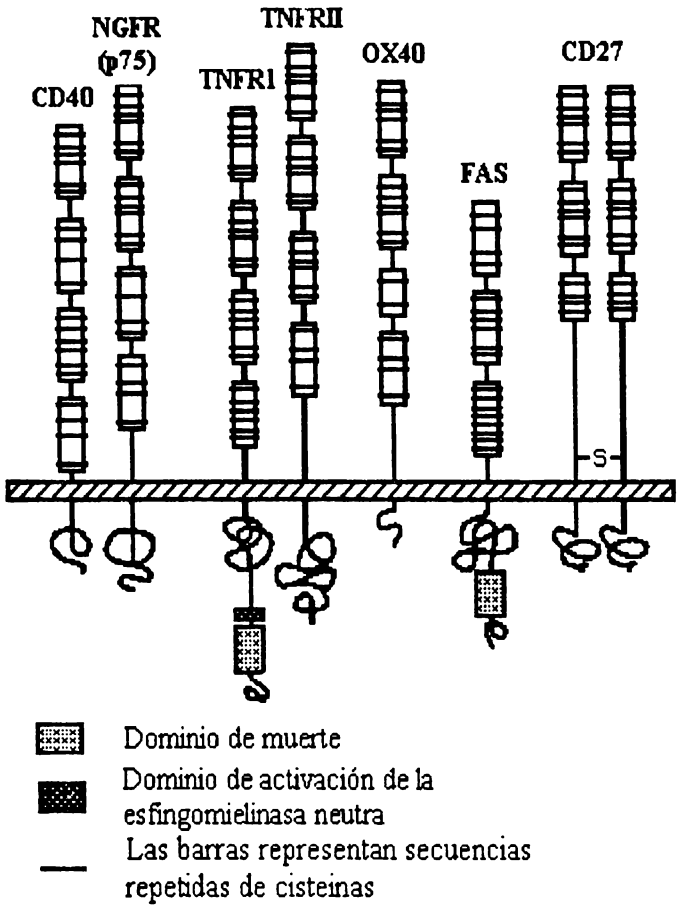
papel de PARP en la apoptosis aún no está bien definido. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que algunos inhibidores de PARP retardan o previenen la muerte y en otros la inhibición de PARP facilita la degradación internucleosomal del DNA (65-66). Cualquiera que sea su papel en la muerte celular, la degradación proteolítica de PARP en estadios tardíos de este proceso es un fenómeno característico de la muerte apoptótica.

RECEPTORES DE TNF.

El primer paso en la inducción de las diversas respuestas celulares inducidas por TNF, es la unión a receptores específicos localizados sobre la superficie de la célula. Se han identificado y clonado dos tipos de receptores para el TNF, los cuales tienen pesos moleculares de 55 (TNFR1) y 75 kDa (TNFR2). El dominio extracelular contiene el sitio de unión del TNF, ambos receptores poseen un 28% de homología en esta región. El dominio transmembranal de un solo cruce es pequeño. El dominio intracelular de los receptores es totalmente diferente en ambos tipos. La falta de homología entre los dominios intracelulares de los 2 tipos de receptores, sugiere que se encuentran involucrados en diferentes señales de transducción. Estos receptores se encuentran presentes sobre la membrana plasmática de casi todos los tipos celulares en diferentes cantidades y proporciones.

Los dos receptores son miembros de la superfamilia de receptores de TNF, que se caracterizan por la presencia de múltiples secuencias repetidas de cisteina (67). En los últimos años esta superfamilia ha crecido rápidamente; entre los miembros de esta se encuentran el antígeno Fas, el receptor de factor de crecimiento neural, el antígeno de células B (CD40) y el antígeno de células T (OX40). Los receptores de TNF comparten una identidad de aproximadamente el 28% con otros dominios extracelulares de un número diverso de proteínas de superficie de membrana, los cuales incluyen al receptor de baja afinidad del factor de crecimiento neural, antígeno Fas, CD40, OX40 y CD27. La mayor parte de esta identidad en secuencia es el resultado de posiciones altamente conservadas en residuos de cisteina (68-71) (Fig. 1).

Figura 1. Representación esquemática de la superfamilia de los receptores de TNF.



Los receptores de TNF se encuentran ampliamente distribuidos en la mayoría de las células y tejidos. Se han encontrado grandes cantidades de los receptores en hígado, riñón y bazo, se encuentran en cantidades modestas en estómago, doudeno, páncreas, colon y esófago (72). El TNF de forma trimérica se une a sus receptores con una constante de disociación que va de 1.3×10^{-9} a 7.1×10^{-11} (73-74). El complejo que se forma es rápidamente internalizado y degradado, lo que implica que los receptores no son reciclados y se requiere de la síntesis de nuevos receptores para mantener un equilibrio en el número de receptores sobre la superficie de la célula (75).

Estudios con anticuerpos contra los receptores de TNF han demostrado que TNFR1 es el receptor que lleva a cabo la mayoría de las actividades pleiotrópicas activadas por TNF, incluyendo citotoxicidad, proliferación de fibroblastos, síntesis de prostaglandina E2, actividad antiviral, inducción del RNAm de la manganeso superóxido dismutasa y la activación del factor de transcripción NF-kB (76-79). La transfección de este receptor ha confirmado su papel en la señal citotóxica, actividad antitumoral y la inducción de diversos RNAm (80-82). Por otra parte, mediante

mutaciones en el dominio intracelular del TNFR1, se ha identificado un dominio de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos hacia el extremo C-terminal del receptor, dentro de una región de 221 residuos, que se requiere y es necesaria para que se inicie la señal citotóxica, lo que ha demostrado la importancia de este dominio en mediar las señales de TNF (83).

El dominio de la señal citotóxica o dominio de muerte contiene una región de 65 residuos de aminoácidos que presentan un 28% de identidad a una región dentro del dominio intracelular del antígeno Fas. Aunque esta identidad no es muy grande, el antígeno Fas es capaz de desencadenar una señal de muerte muy similar a la producida por TNF a través de TNFR1 (68, 83).

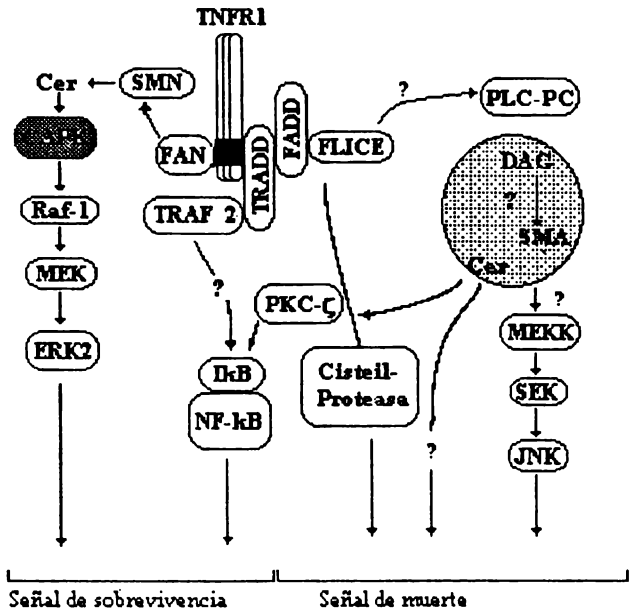
Recientemente, mediante mutaciones en el dominio intracelular del TNFR1 se ha identificado un dominio de activación de la esfingomielinasa neutra (NSD); este dominio contiene 11 residuos de aminoácidos adyacentes al extremo N-terminal del dominio de muerte. El NSD es necesario y suficiente para mediar la activación de la esfingomielinasa neutra (84).

SEÑALES DE TRANSDUCCION INDUCIDAS POR TNF.

En general, para todas las citocinas el mecanismo de transducción de señales se inicia con la interacción del factor con sus receptores de membrana, lo que desencadena toda una cascada de señales que se llevan a cabo dentro de la célula. El camino más directo de transducción de señales es cuando los receptores poseen actividad de cinasa intrínseca en sus dominios intracelulares. Este no es el caso para los receptores de TNF y los demás miembros de la familia, ya que no presentan una cinasa intrínseca. Un segundo mecanismo incluye la activación de fosfolipasas, mediada por el receptor, la cual resulta en la generación de segundos mensajeros (85). En el caso de citocinas pleiotrópicas como el TNF, se han descrito diferentes mecanismos de transducción de señales para explicar sus múltiples actividades biológicas (Fig. 2A).

Figura 2. Modelo de las proteínas reclutadas por TNFR1.

A. Representación esquemática de las señales de transducción desencadenadas por TNFR1.



TNFR1 Receptor de TNF tipo I

SMN Esfingomielinasa neutra

SMA Esfingomielinasa ácida

Cer Ceramida

DAG Diacilglicerol

MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos extracelulares.

MEK Proteína cinasa cinasa de MAPK

JNK Proteína cinasa nuclear de Jun

NF-κB Factor de transcripción de la cadena κ de anticuerpos producidos por células B

FLICE Proteína homóloga de FADD

TRAF2 Factor asociado al receptor tipo 2 de TNF

CAPK Proteína cinasa dependiente de ceramida.

PLC-PC Fosfolipasa C dependiente de fosfatidil-colina.

FAN Factor asociado al dominio de SMN.

PKC-ζ Proteína cinasa C-ζ.

ERK2 Proteína cinasa regulada por señales

MEKK Proteína cinasa que fosforila MEK.

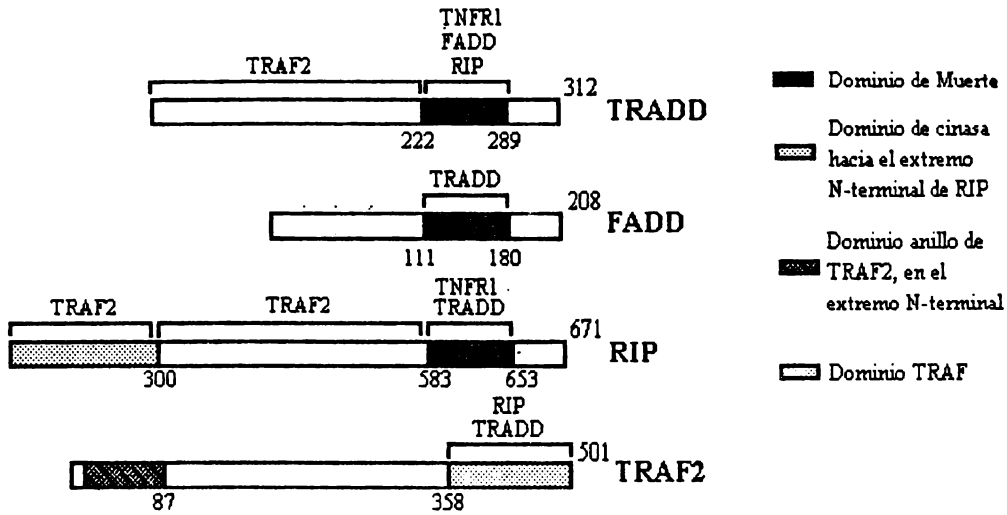
SEK Proteína cinasa cinasa activada por estrés

IκB Inhibidor de NF-κB

FADD Proteína asociada al dominio de muerte de FAS.

TRADD Proteína asociada al dominio de muerte del receptor de TNF tipo 1.

B. Representación esquemática de los dominios de las proteínas acopladoras al receptor de TNF y sus blancos de interacción.



A: esquema modificado de la referencia 172; B: esquema modificado de la referencia 173.

Unión de proteínas acopladoras al receptor de TNF

En los últimos años se han identificado dos familias de proteínas que se asocian directamente con el dominio citoplásmico de los miembros de la familia de proteínas del receptor de TNF, lo que ha permitido avanzar un paso más en la compresión de la señal de transducción de TNF.

La primera familia comprende tres proteínas denominadas TRADD, FADD y RIP que interaccionan con el dominio de muerte de TNFR1 y el antígeno Fas. TRADD es una proteína de 34 kDa que interactúa específicamente con TNFR1. El dominio carboxilo terminal posee un 23% de identidad con el dominio de muerte de TNFR1 (86). FADD/MORT1 y RIP son proteínas de 23 y 74 kDa respectivamente, e interactúan con el dominio de muerte de Fas. La expresión de mutantes en el dominio amino-terminal de FADD/MORT1 bloquean la señal citotóxica desencadenada por los receptores Fas o TNFR1, indicando que esta región participa en la transmisión de esta señal en ambos receptores a través de interacciones proteína-proteína (87-88, Fig. 2B). RIP además de tener semejanza con el dominio de muerte, contiene un dominio de cinasa en su región amino-terminal; RIP es hasta el momento la cinasa más cercana al receptor (89, Fig. 2B). La sobreexpresión de estas tres proteínas puede mimetizar algunas respuestas celulares como apoptosis y activación del factor nuclear NF-kB, lo que sugiere que estas proteínas son elementos importantes en la transducción de señales de los receptores TNFR1 y Fas.

La segunda familia de proteínas que se asocia con los miembros de la familia de receptores de TNF son conocidos como TRAFs. TRAF1 y TRAF2 son proteínas de 45 y 56 kDa respectivamente, las cuales fueron co-purificadas en asociación al TNFR2 (90). TRAF1 y TRAF2

existen en un complejo multimérico que interactúa con los dominios intracelulares de TNFR2 y CD40 (90-91). TRAF3 fue identificada como una proteína 64 kDa asociada a CD40 (59-62). Estas tres proteínas comparten homología en su extremo C-terminal que se encuentra altamente conservado. Este dominio, de aproximadamente 150 aminoácidos, es el que se encuentra involucrado en la oligomerización (90-91, 93). Por otra parte, formas mutadas de TRAF2 en su extremo N-terminal, en el dominio llamado anillo, actúan como inhibidores de la activación de NF-kB mediada tanto por TNF, como por CD40 (91, Fig. 2B).

Recientemente, se ha identificado una proteína que se une al dominio de activación de la esfingomielinasa neutra, conocida como FAN (Factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra). El análisis de la secuencia del cDNA predice una proteína de 917 residuos de aminoácidos con un peso molecular aproximado de 104 kDa. Esta proteína pertenece a una familia que se caracteriza por poseer al menos cuatro secuencias de Asp-Trp repetidas. Estas secuencias parecen ser la parte estructural que facilita interacciones proteína-proteína de manera específica. La región de FAN que se requiere para la asociación con el receptor TNFR1, se localiza hacia el extremo C-terminal; ésta región contiene cuatro de las cinco regiones repetidas de Asp-Trp, lo que sugiere que la interacción con el receptor TNFR1 es mediada por ésta región. Mutaciones en la región Asp-Trp disminuyen la activación de la esfingomielinasa neutra inducida por TNF (96).

Activación de cisteil-proteasas.

La inhibición de la muerte celular inducida por TNF y el ligando de Fas por la serpina crmA fue la primera evidencia de la participación de cisteil-proteasas en la señal de transducción de TNFR1 (63). *In vitro*, la serpina crmA interactúa con formas activas de ICE y miembros de esta familia (54). Yama y ICE-LAP3 solo son expresadas como zimógenos y son procesados proteolíticamente cuando los receptores TNFR1 o Fas han sido ocupados, lo que sugiere que se necesita una enzima parecida a ICE para activar a Yama y a ICE-LAP3 (59, 88).

Recientemente, se encontró otra cisteil-proteasa de la familia de ICE/CED-3, la cual contiene un prodominio homólogo a FADD, por lo cual se le llamó FLICE (FADD like ICE). La presencia de este prodominio le permite a FLICE unirse a FADD. FLICE es hasta el momento la proteasa más cercana al receptor con esta actividad enzimática (97).

Activación de proteína cinasa C

Se ha encontrado que diversas proteínas son fosforiladas unos minutos después de que la célula ha sido tratada con TNF, lo cual parece deberse a la activación de proteínas cinasas. Por ejemplo, se ha propuesto que una proteína cinasa C (PKC) se encuentra involucrada en la señal de transducción de TNF, aunque los mensajeros típicos para la activación convencional de las PKCs, como calcio ó fosfatidilinositol 3,4-bifosfato derivado de inositol trifosfato, no son generados por TNF. (98). La producción rápida de diacilglicerol (DAG) ha sido demostrada en varias líneas leucémicas humanas, pero el subtipo de PKC que es activada por TNF no ha podido ser identificado (99). En los últimos años se han producido indicios que una PKC ζ es activada por TNF. Esta PKC está clasificada como atípica, porque es independiente de ésteres de forbol, no es translocada a la membrana, y no es regulada negativamente por exposición continua a ésteres de forbol (100).

Activación de fosfolipasa A_2 (PLA_2)

En muchos tipos celulares, se ha propuesto que el TNF activa una fosfolipasa citosólica del subtipo A2, la cual produce ácido araquidónico (AA). El AA posee varios blancos celulares potenciales; por ejemplo, puede iniciar la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (101-104). En algunos casos, las fosfolipasas A_2 participan en la señal de transducción de receptores acoplados a proteínas G, que son proteínas que enlazan nucleótidos de guanina (105-106). Existen evidencias experimentales que sugieren que la activación de proteínas G ocurre como parte de la señal de transducción del TNF. El tratamiento con esta citocina produce un aumento en el enlace de nucleótidos de guanina en membranas de células L929 y HL-60, y este aumento es paralelo a un incremento en la actividad GTPasa, la cual es inhibida por el pretratamiento con toxina pertusis. La toxina pertusis ADP ribosila a las proteínas Gt, Gi y G0, lo que las desacopla de sus receptores. Existen datos en células L929 donde el pretratamiento con toxina pertussis provoca una reducción en la citotoxicidad mediada por TNF (107-109).

Activación de esfingomielinasas.

Existe evidencia de que el TNF es capaz de activar de manera independiente tanto a una esfingomielinasa neutra como a una ácida; la ceramida generada por la acción de estas dos enzimas parece tener efectos biológicos diferentes y algunas veces opuestos (110-111).

Activación de una esfingomielinasa ácida

En las células promielocíticas U937 y en las células T Jurkat, se ha demostrado que el TNF inicia secuencialmente la activación de una fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina y subsecuentemente una esfingomielinasa ácida a través del TNFR1. La ceramida generada por esta enzima produce eventos posteriores como la activación del factor de transcripción NF-κB (110, 112). La activación de la esfingomielinasa ácida se incia a través del dominio de muerte del TNFR1, sin que hasta el momento se sepa si es directa o indirectamente (83, 110).

Activación de una esfingomielinasa neutra

La segunda vía que activa TNF activando el ciclo de la esfingomielina, se da a través de una esfingomielinasa neutra unida a la membrana plasmática (113). La producción de ceramida por medio de esta enzima provoca la activación de proteínas cinasas que reconocen una secuencia consenso que necesita una prolina hacia el C-terminal de la proteína, las cuales podrían ser responsables de la activación de la PLA_2 (49, 110, 111). Entre las proteínas cinasas que forman esta familia se encuentran, la proteína cinasa dependiente de ceramida (114), miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (50) y las proteínas cinasa activadas por estrés (JNK) (51). Recientemente, se ha demostrado que la esfingomielinasa neutra media la activación de la proteína cinasa Raf-1 inducida por TNF (52), posiblemente involucrando a una proteína cinasa dependiente de ceramida, lo cual uniría al receptor TNFR1 con la cascada de señales de las MAPK (115).

Activación de la proteína cinasa dependiente de ceramida (CAPK)

Se ha reportado que el tratamiento con TNF, ceramida o análogos sintéticos de ceramida activan una seril/treonil cinasa distinta a PKC. Esta proteína cinasa fosforila al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el residuo de treonina 669, que se encuentra localizado próximo al dominio transmembranal y al sitio de unión a ATP dentro del sitio catalítico del receptor. Esta región contiene la treonina 664, sitio principal de fosforilación de PKC (116). En general, esta región se considera como el sitio que modula la velocidad de internalización del receptor.

La proteína cinasa dependiente de ceramida pertenece a una nueva familia de proteínas cinasas, la cuales reconocen una secuencia consenso dirigida por prolina, X-Ser/Thr-Pro-X; esta familia incluye proteínas cinasas como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la cdc2 (117-118).

La proteína cinasa dependiente de ceramida ha sido cuantitativamente solubilizada a partir de membranas mediante el uso de detergentes, se ha purificado parcialmente por una cromatografía de intercambio aniónico, enfoque isoeléctrico y un protocolo de desnaturalización y renaturalización en geles de acrilamida. Todos estos estudios han demostrado que es una proteína que se encuentra unida a la membrana con un peso aparente de 97 kDa, que coincide con el peso que se muestra en los geles de actividad. Por otra parte, el pretratamiento con ceramida aumenta la actividad de esta proteína cinasa de 5 a 10 veces, propiciando su autofosforilación y la de otros substratos con la misma secuencia consenso. Hasta el momento, no se ha determinado si esta proteína cinasa es un blanco directo de la ceramida o si su activación es a través de la unión de alguna proteína reguladora (114-115).

Activación de una proteína fosfatasa dependiente de ceramida (CAPP)

Recientemente, en ensayos *in vitro* se encontró que el TNF, la ceramida y un análogo sintético, la C2-ceramida, pero no otros esfingolípidos relacionados son capaces de activar una proteína fosfatasa citosólica (119). Esta proteína fosfatasa dependiente de ceramida es una seril/treonil fosfatasa perteneciente a la subfamilia de proteínas fosfatasas heterotriméricas de tipo 2A (120). Esta fosfatasa se encuentra en una gran variedad de tejidos de mamíferos *in vivo* como heterotrímero que consiste de la subunidad catalítica *C* que pesa 36 kDa, una subunidad reguladora *A* de 65 kDa y una de varias subunidades reguladoras *B* que van de 54-74 kDa; también se encuentra como un heterodímero que consiste de las subunidades C y A (121, Tabla 2). La actividad de la proteína fosfatasa dependiente de ceramida es insensible a la adición de cationes. Sin embargo, la adición de análogos de ceramida aumenta su actividad de fosfatasa. Estudios subsecuentes han demostrado que la subunidad catalítica es activada directamente por ceramida, lo que sugiere la existencia de un sitio de unión a ceramida (122). Todo esto ha llevado a pensar que esta proteína fosfatasa del tipo 2A podría ser uno de los blancos directos de la ceramida.

Tabla 2. Formas de la proteína fosfatasa 2A, su activación por ceramida y sensibilidad a ácido okadaico.

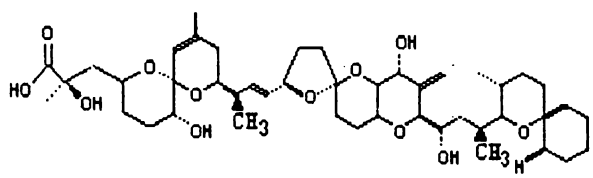
Forma de la proteína fosfatasa 2A	*Subunidad o complejo*	*Activación por ceramida*	*Suceptibilidad a ácido okadaico*
C_{humana} (36 kDa)	Subunidad Catalítica	+	+
ABαC	Heterotrímero	+	+
AB'C	s	+	+

CAPP (HL-60 y T9)		+	+
AC	Heterodímero	+	?

Tabla modificada de las referencias 122, 123, 160.

Una herramienta poderosa para caracterizar seril/treonil fosfatasas es la utilización de ácido okadaico (AO) como inhibidor (123, Fig. 3). El AO es un poliéter complejo que se aísla a partir de esponjas marinas. Este compuesto es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasas 2A (IC_{50}= 1nM). En concentraciones altas también es capaz de inhibir a proteínas fosfatasas de tipo 1 (IC_{50}= 15-40nM) (124). La actividad de la proteína fosfatasa dependiente de ceramida, activada con 5μM de C2-ceramida, puede ser inhibida hasta en un 75% en presencia de 1 nM de AO. Estudios *in vitro* de cinética enzimática sugieren que el AO inhibe competitivamente a esta enzima (119).

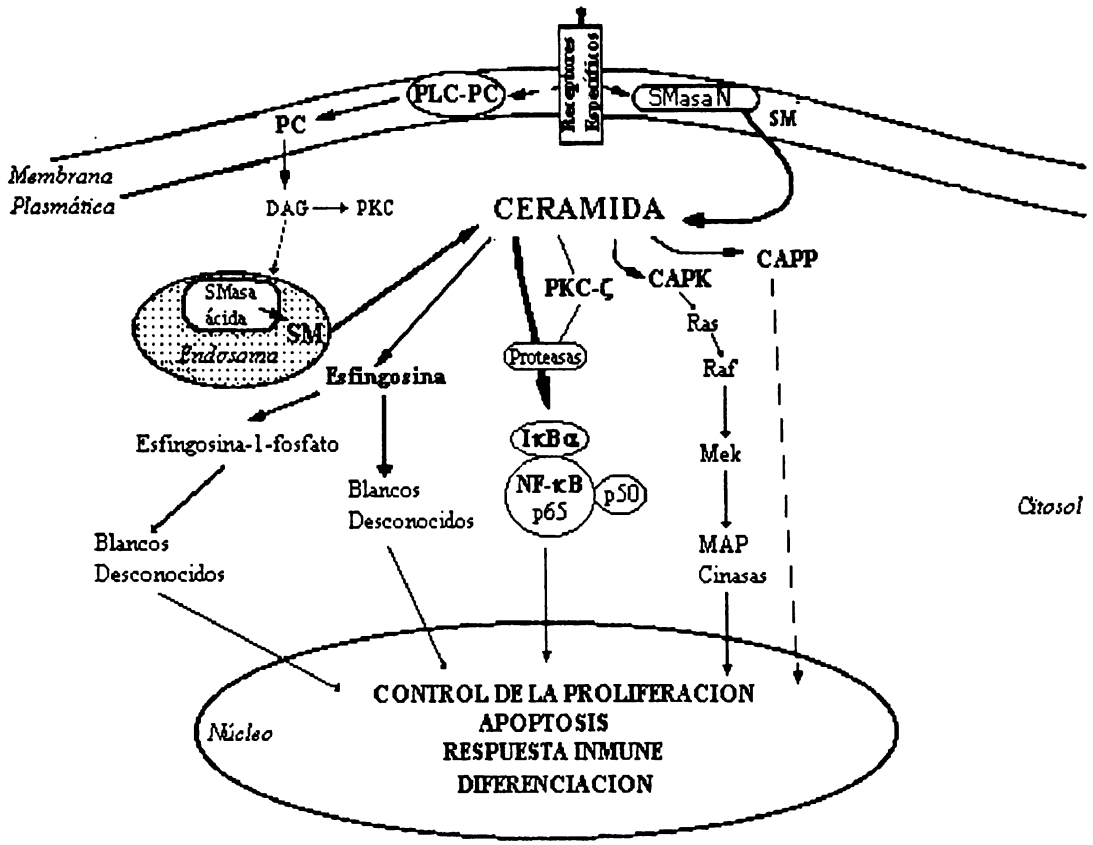
Figura 3. Estructura del ácido okadaico.



2. CERAMIDA COMO SEGUNDO MENSAJERO.

Recientemente, se ha sugerido que el ciclo de la esfingomielina es importante en la transducción de señales de diversas citocinas, entre las que se encuentra el TNF (125). El ciclo de la esfingomielina se inicia con la activación de una esfingomielinasa (neutra o ácida) que hidroliza la esfingomielina generando fosfocolina y ceramida. La ceramida modula diversos eventos como la activación de fosfatasas (119-120), fosforilación de proteínas (126-127), regulación negativa del proto-oncogen *c-myc* (128) y apoptosis (129), por lo que la ceramida y/o alguno de sus productos metabólicos son considerados como segundos mensajeros (Fig. 4).

Figura 4. Representación esquemática del ciclo de la esfingomielina y sus efectos celulares.



CAPP Proteína fosfatasa dependiente de cermida

SMasaN Esfingomielinasa neutra

SMasaA Esfingomielinasa ácida

Cer Ceramida

DAG Diacilglicerol

CAPK Proteína cinasa dependiente de ceramida.

PLC-PC Fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina.

SM Esfingomielina

PKC-ζ Proteína cinasa C-ζ.

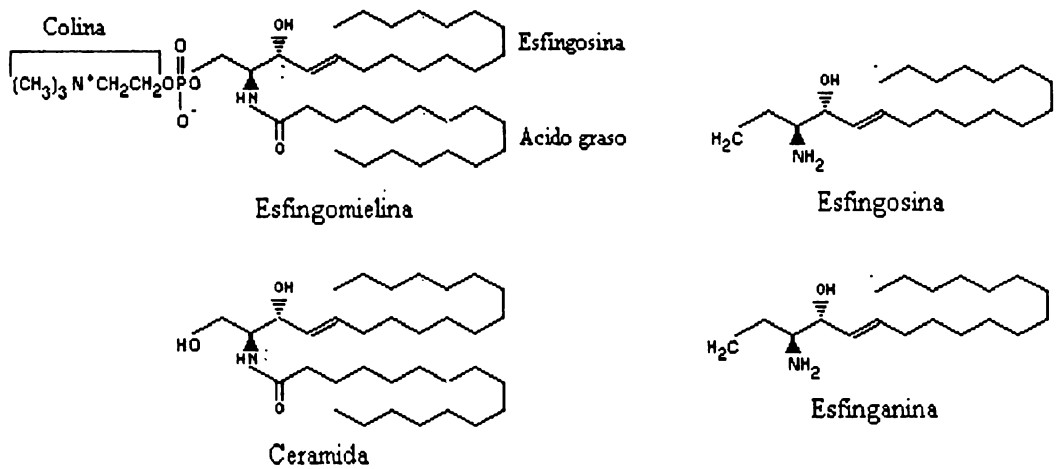
Esquema modificado de la referencia 174.

Generalidades de esfingolípidos

Los esfingolípidos son lípidos complejos cuyo esqueleto esta constituido por la esfingosina o una base relacionada (Fig. 5). Se encuentran comúnmente en la cara externa de la membrana plasmática con un papel estructural importante, determinando la densidad de carga de superficie de la membrana. Además, contribuyen en la composición del glicocálix y participan en el reconocimiento intercelular definiendo entre otras cosas los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos. En los últimos años se ha encontrado que son componentes integrales de varias señales

en diversos tipos celulares (130-131). Los esfingolípidos existen en grandes cantidades en los tejidos periférico y central, y se encuentran trazas de ellos en depósitos de grasa. Todos los esfingolípidos contienen tres componentes básicos: una molécula de ácido graso, una molécula de esfingosina o alguno de sus derivados y un grupo de cabeza polar formada por colina y un ácido fosfórico, el cual, en algunos esfingolípidos es muy grande y complejo. La síntesis de los esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y el aparato de golgi de manera separada a la del resto de los lípidos de membrana (132).

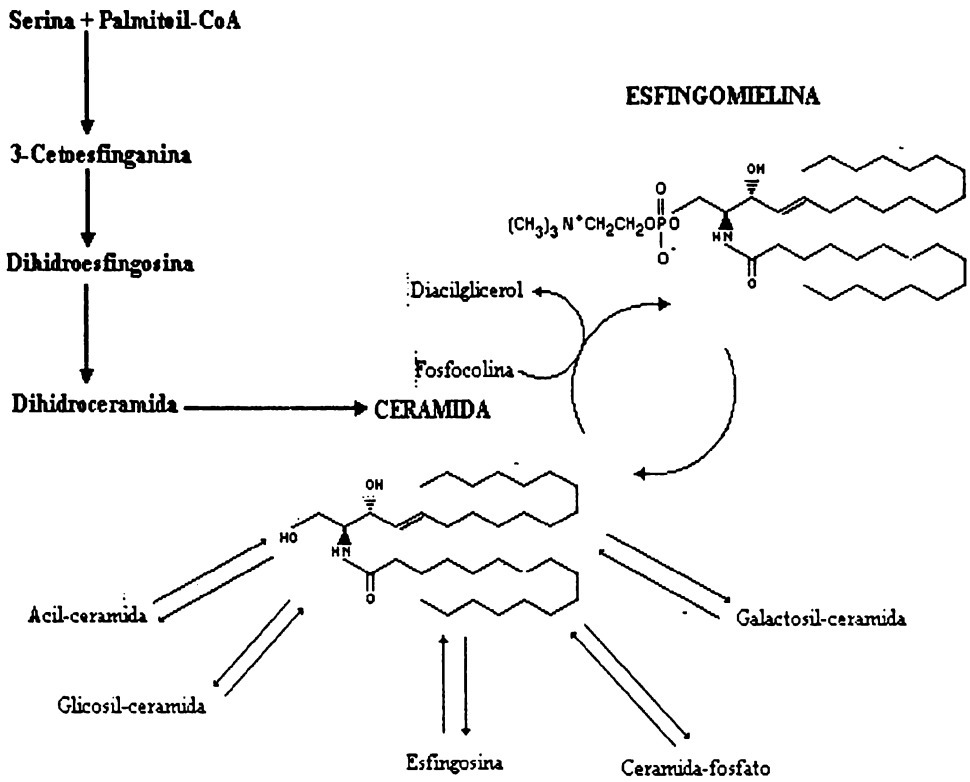
Figura 5. Estructura de los principales esfingolípidos.



Metabolismo de ceramida

La biosíntesis *de novo* de la ceramida se inicia por condensación de la serina y la palmitoil-CoA, lo que resulta en la formación de 3-cetoesfinganina (3-cetodihidroesfingosina), la cual es posteriormente reducida a dihidroesfingosina. La dihidroceramida es formada por el enlace de un grupo acilo de un ácido graso a la dihidroesfingosina. Estudios de pulso y caza indican que la ceramida es formada a partir de dihidroceramida por la introducción del doble enlace en los carbonos 4,5 en posición *trans* (133) (Fig. 6).

Figura 6. Ruta de biosíntesis de la ceramida.



Una vez formada la ceramida, ésta sirve como precursor de otros esfingolípidos complejos como galactosilceramida, glicosilceramida, acilceramida y ceramida fosfato (134-137). La biosíntesis de esfingomielina involucra la adición de la cabeza polar a través de la transferencia de colina fosfato a partir de fosfatidilcolina por la acción de la fosfatidilcolina:ceramida colinafosfotransferasa (132). En la mayoría de los casos la cabeza polar es la fosfocolina, aunque existe una pequeña proporción de fosfoetanolamina. Este paso enzimático, en el que se transfiere la base unida al grupo fosfato libera simultáneamente diacilglicerol, por lo que sirve para regular simultáneamente los niveles de ceramida y diacilglicerol (138).

La ceramida también sirve como penúltimo esfingolípido en diversas rutas del catabolismo de esfingolípidos. El rompimiento de esfingolípidos complejos por acción de hidrolasas ácidas resulta en la formación de ceramida. De la misma manera, la ceramida es formada por la hidrólisis de esfingomielina por acción de esfingomielinasas (139-140).

El estudio del catabolismo de la ceramida en mamíferos es aún limitado. Sin embargo, se han encontrado tres ceramidasas que se distinguen por sus puntos óptimos de pH (141). La acción de estas enzimas resulta en la formación de esfingosina, la cual puede reformar ceramida o ser degradada (142-143).

Las enzimas que participan en el metabolismo de la ceramida se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico. El sitio en la célula donde es introducido el doble enlace a la ceramida aún no es conocido, pero es de gran importancia, ya que las dihidroceramidas carecen de actividad biológica. Por otra parte, la transformación de la ceramida en esfingolípidos más complejos ocurre en el aparato de golgi.

Efectos biológicos de la ceramida

La proliferación celular, migración, diferenciación y apoptosis son procesos esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en un organismo, tanto durante su desarrollo como en su estadio adulto. Los mecanismos moleculares que regulan estos procesos varían de acuerdo al tipo celular, localización de la célula en el organismo, y el momento del desarrollo. Recientemente, se ha implicado a la ceramida en varios eventos bioquímicos de estas respuestas celulares (Tabla 3).

Tabla 3. Factores que inducen el ciclo de la esfingomielina y los posibles blancos celulares y moleculares de la ceramida.

Estímulo	*Blanco celular*	*Posible blanco molecular*	*Efecto biológico*
TNF, IFN-γ, vitamina D3	Células promielocíticas HL-60	CAPK, CAPP y expresión de c-myc	Diferenciación monocítica e inhibición de la proliferación.
TNF	Células T Jurkat	NF-κB	Citotoxicidad
TNF	Células monocíticas U937	NF-κB, MAPK	Apoptosis
IL-1β, TNF	Fibroblastos epidérmicos humanos RA	Cox y promotor de IL-6	Inducción de PGE2 y producción de IL-6
IL-1β	Células de timoma EL-4	CAPK	Secreción de IL-2
NGF	Células de glioma T9	CAPP	Inhibición de la proliferación y diferenciación neural.
Ligando de Fas	Células monocíticas U937	Endonucleasas	Apoptosis
Radiación-γ	Células endoteliales aórticas	Endonucleasas	Apoptosis
?	NIH-3T3	PKC-ζ, NF-κB	?
Deprivación de suero	Células T MOLT-4	Desfosforilación de proteína del gen de	Inhibición de la proliferación

		retinoblastoma (Rb)	
IL-2	Células T, Células T Jurkat	NF-κB, NF-AT	Estímulación de la proliferación

Efecto sobre la proliferación y diferenciación

Parece existir una relación directa entre la activación del ciclo de la esfingomielina y la diferenciación de las células promielocíticas HL-60 (113, 125, 128). La ceramida y los agonistas que aumentan la hidrólisis de esfingomielina en estas células (Vitamina D3, TNF e IFN-γ) también inducen su diferenciación hacia el linaje monocítico. Por otra parte, los ligandos que inducen la diferenciación de las células HL-60 hacia el linaje granulocítico (ácido retinoico, dibutiril AMP cíclico, o dimetil sulfóxido), o hacia macrófagos (ésteres de forbol) no inducen la hidrólisis de la esfingomielina. La adición exógena de esfingomielinasa o C2-ceramida mimetizan el efecto diferenciador de vitamina D3, TNF e IFN-γ (144). Investigaciones recientes indican que la ceramida es generada como resultado de la activación del receptor CD28, el cual puede generar una señal mitogénica en las células leucémicas T Jurkat (130).

Apoptosis

Uno de los primeros reportes en los cuales se involucró a la ceramida en la apoptosis fue en estudios de la muerte inducida por el TNF en células promielocíticas U937; en estas células la C2-ceramida fue capaz de mimetizar la muerte inducida por el TNF (129). La adición de C8-ceramida o de esfingomielinasa exógena también mimetizan los efectos producidos por el TNF. Ya que este efecto puede ser prevenido por la adición de diacilglicerol sintético, fosfolipasa C o ésteres de forbol, se ha sugerido que la vía de la proteína cinasa C puede antagonizar la vía de la esfingomielina (145). Otras evidencias que sugieren antagonismo entre estas dos vías provienen de estudios con nuetrófilos en los cuales el TNF induce un incremento de ceramida y esfingosina previa a la inducción de la apoptosis (146).

Inflamación

Células no hematopoyéticas como los fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales y condrocitos participan en la respuesta inmune e inflamatoria. Estas células producen citocinas, prostaglandinas y otros factores capaces de modular éstas respuestas. Por ejemplo, los fibroblastos y macrófagos producen prostaglandina E_2 (PGE_2), que actúa como un vasodilatador y modula la

actividad de otros vasodilatadores. La vasodilatación incrementa el acceso de las células circulantes a áreas de depósito de antígenos.

La inducción de la síntesis PGE_2 por adición exógena de ceramida, esfingosina o esfingomielinasa bacteriana, fue la primera conexión entre el proceso de inflamación y el ciclo de la esfingomielina (147). Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con TNF o IL-1β, puede provocar un aumento en la ceramida, generando un aumento sinergístico en la inducción de PGE_2 (148).

Eventos bioquímicos posteriores a la ceramida.

Para poder entender como es que la hidrólisis de la ceramida y su consecuente acumulación pueden ser mediadores de diversos efectos biológicos es necesario identificar los blancos potenciales directos o indirectos de la ceramida. Hasta el momento se han identificado varios blancos moleculares, los cuales incluyen a la proteína cinasa CAPK, la proteína fosfatasa CAPP, la proteína cinasa C-ζ, la fosfolipasa A_2, el factor de transcripción NF-κB y el producto del gen del retinoblastoma, Rb. Todos estos blancos moleculares pueden ser afectados por el ciclo de la ceramida. Sin embargo, se desconoce si los efectos mediados por la ceramida son directos o indirectos (Fig. 4).

JUSTIFICACION

Como ya se ha mencionado en la sección precedente, en los últimos años, se ha involucrado al ciclo de la esfingomielina como una nueva ruta de señales de transducción que puede mediar las respuestas biológicas de diversos factores como el TNF, el interferón-γ, la vitamina D3 y la interleucina-1β. Se ha propuesto que la ceramida proveniente de la hidrólisis de esfingomielina es el metabolito activo que puede funcionar como el segundo mensajero de las respuestas celulares de estos factores. Se ha reportado que el TNF estimula la producción de ceramida en ciertas líneas celulares de origen hematopoyético. Además, se ha demostrado que en células de origen hematopoyético, análogos sintéticos de ceramida, como la C2-ceramida, inducen la degradación internucleosomal del DNA y la muerte. Sin embargo, no ha podido quedar bien establecido si el ciclo de la esfingomielina se activa en el proceso de muerte desencadenado por TNF en células de origen no hematopoyético.

Por otra parte, se han propuesto diversos blancos de la ceramida, los cuales incluyen diversas proteínas cinasas y en los últimos años se ha demostrado que la ceramida puede activar *in vitro* a una proteína fosfatasa 2A, sensible a ácido okadaico, por lo que esta fosfatasa ha sido propuesta como posible blanco directo de la ceramida. Sin embargo, se desconoce en que procesos activados por TNF o ceramida pudiera participar una fosfatasa de este tipo.

OBJETIVO GENERAL

Valorar el papel de la ceramida en el programa de muerte encendido por el TNF en la línea de fibroblastos de pulmón L929 de origen murino; probar de manera indirecta la participación de una proteína fosfatasa 2A, utilizando un inhibidor de fosfatasas.

OBJETIVOS PARTICULARES

* Utilizando clonas sensibles y resistentes a TNF derivadas de la línea celular L929, evaluar el posible efecto citotóxico de C2, C6 y C8-ceramida, así como de la C2-dihidroceramida.

* Evaluar el efecto citotóxico de un aumento de ceramida endógena producido por la adición exógena de esfingomielinasa, en clonas sensibles al TNF.

* Evaluar si el tratamiento con TNF es capaz de inducir cambios en los niveles basales de la ceramidas endógenas sensibles al TNF.

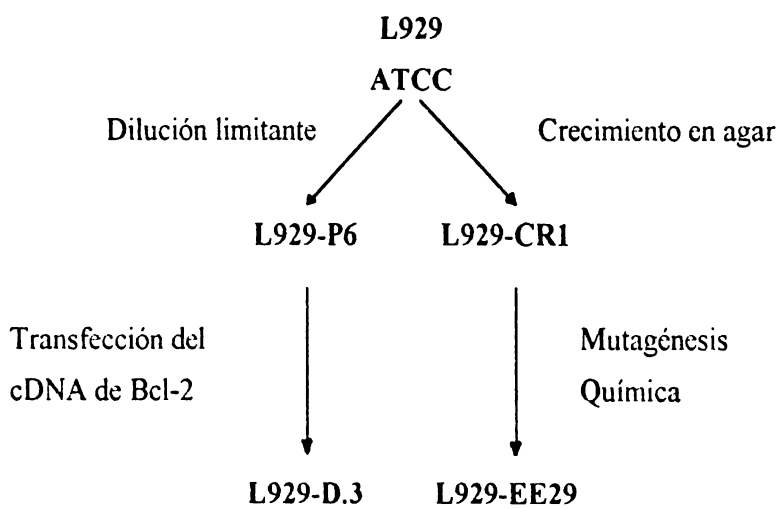
* Evaluar de manera indirecta, la posible participación de una proteína fosfatasa mediante la utilización de ácido okadaico, un inhibidor de proteínas fosfatasas.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones de cultivo.

La línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L929 se obtuvo de ATCC y se utilizó como una población total, de la cual previamente se habían obtenido las diferentes clonas utilizadas en el presente trabajo. Las clonas L929-P6 y L929-CR1 como clonas altamente sensibles al efecto citotóxico de TNF (R&D Systems), la clona L929-P6, sensible a puromicina (Sigma), se obtuvo por dilución limitante y la clona L929-CR1 se obtuvo como una clona capaz de crecer en agar semisólido (149). Las clonas resistentes a TNF se obtuvieron a partir de las clonas sensibles a TNF. La clona L929-D.3 fue obtenida a partir de la clona L929-P6, por transfección estable del plásmido pBabePurobcl-2 (150) con fosfato de calcio (GIBCO-BRL); la clona fue aislada por su resistencia a puromicina (5μg/ml) y a TNF (5ng/ml). La clona L929-CR1 fue sometida a mutagénesis química con etilmetano sulfonato (Kodak), de la cual se aisló la clona L929-EE29 por ser resistente a TNF.

Las células se colocaron en cajas de cultivo de 60 x 25 mm, agregando 5 ml de medio mínimo esencial (GIBCO-BRL, Apéndice 1), suplementado con 1mM de glutamina (GIBCO-BRL), 10% de suero fetal de bovino (In vitro, México), previamente desactivado y suplementado con 50μM de sulfato de gentamicina. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C, en una atmósfera con 5% de bióxido de carbono y un ambiente saturado de humedad. Las células utilizadas para los ensayos experimentales se sembraron a una densidad de 20 000 cel/cm^2 para las clonas L929-P6 y L929-D.3, y de 10 000 cel/cm^2 para las clonas L929-CR1 y L929-EE29.



Ensayos de citotoxicidad.

Las células se sembraron en medio completo con los diversos factores a las concentraciones y tiempo indicados en cada figura. La concentración y el tiempo optimo de incubación con TNF para observar muerte celular ya habían sido establecidos previamente en el laboratorio.

El porcentaje de muerte fue evaluado por la técnica enzimática de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo (LDH), expresada como porcentaje de actividad enzimática liberada al medio de cultivo, con respecto al porcentaje de actividad enzimática total de células lisadas con detergente. Después de terminado el tiempo de incubación con los análogos de ceramida o TNF, se tomaron 40µl de medio de cultivo de cada uno de los pozos. Se cultivó el remanente en el pozo (normalemente 460 µl), se le adicionaron 5µl de Triton-X100 al 10% preparado en medio de cultivo, Se incubaron a 37 °C por 10 minutos y se colectó una segunda muestra de medio (40µl) de cada pozo. De esta última muestra se calculó el 100% de actividad en el ensayo.

La actividad enzimática de LDH fue evaluada midiendo la caída de absorbancia a 340 nm debida a la disminución de NADH utilizado por la reducción de piruvato en presencia de LDH. La determinación de LDH liberado se hizo espectrofotométricamente adicionando 17 µl de la primera muestra de medio colectada más 833 µl de una solución de TRIS 81.3 mM, NaCl 203.3 mM, NADH 0.244 mM, pH 7.2 a una celda de vidrio de 12.5 x 12.5 x 45 mm. (Sigma). La caída en la densidad óptica de 340 nm se registró por 2 minutos para eliminar posibles substratos endógenos presentes en la muestra. Después, se adicionaron 170 µl de una solución TRIS 81.3 mM, NaCl 203.3 mM, piruvato 9.76 mM y se siguió la caída en la misma densidad óptica (340 nm) por otros 2 minutos. La actividad enzimática se calculó con la velocidad de disminución de NADH de la mezcla de reacción con piruvato de acuerdo a procedimientos publicados (151).

Extracción y cuantificación de ceramida.

Los lípidos fueron extraídos de células tratadas con 5 ng/ml de TNF a los tiempos indicados en las figuras, de acuerdo al método de Blight y Dyer (151). Para cuantificar la ceramida se utilizó una versión modificada del ensayo de diglicérido cinasa (Ver reacción abajo, 175). Las muestras de lípidos fueron resuspendidas en 20 µl de una suspensión de octil-β-D-glucopiranósido/L-α-dioleil-fosfatidilglicerol (βOG/DOPG, 7.5%:25mM; Calbiochem) e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Se adicionaron 70 µl de mezcla que contiene 16 µg/ml de diglicérido cinasa (DGK) preparada en nuestro laboratorio y 0.2 µl de DTT 1M; la reacción se inició mediante la adición de 10µl de 10mM de ATP frío, suplementado con 1µCi de [γ-32P] ATP. La reacción de fosforilación se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvo mediante la adición de 3 ml de cloroformo/metanol (1:2). Se adicionaron secuencialmente 0.7 ml de agua, 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua. Las fases se separaron centrifugando a 3 000 r.p.m. por 5 minutos, descartando la fase acuosa. De la fase orgánica se colectó 1.5 ml que se secaron bajo una atmósfera de nitrógeno. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de cloroformo; 25 µl de cada muestra se cargaron en placas de cromatografía en capa fina (Whatman Silica Gel 60A), para separar la fosfoceramida. La cromatografía se corrió en un sistema de cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua 10:4:3:2:1.

La fosfoceramida fue cuantificada de acuerdo a la marca incorporada utilizando el sistema STORM (Molecular Dynamics).

Reacción de la DGK:

Ceramida + ATP ⟶ Ceramida-1-fosfato + ADP

Medición de fósforo total en las muestras lipídicas.

A las alícoutas de los lípidos se les adicionó 100 µl de $Mg(NO_3)_2$ al 10% en etanol. Las muestras se calentaron a 80 °C por 20 minutos. Los tubos se calentaron directamente a la flama hasta que el gas café dejó de salir y se formó un precipitado blanco. Se adicionaron 0.3 ml de HCl 0.5N a cada muestra y se hirvió por 15 minutos. A cada tubo se adicionaron 0.6 ml de molibdato de amonio al 0.42% en H_2SO_4 1N y 0.1 ml de ácido ascórbico al 10%. Las mezclas se incubaron 30 minutos a 45 °C. y se leyó su densidad óptica a 820 nm.

La cantidad de fosfoceramida obtenida del ensayo de diglicérido cinasa se normalizó contra la cantidad de fosfato de cada muestra. La cantidad de ceramida se reportó como incremento de fosfoceramida normalizada de cada muestra sobre la fosfoceramida normalizada en el control negativo correspondiente a extractos de lípidos obtenidos de células sin tratamiento.

Análisis estadístico.

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en las determinaciones de lactato deshidrogenasa, se utilizó la prueba T de Student (153), por medio de la cual se comparan las medias y desviaciones normales de los grupos de datos, con la finalidad de determinar si entre los parámetros las diferencias son estadísticamente significativas. En este trabajo se comparó el valor del control negativo (células sin ningún tratamiento), con el valor obtenido con cada uno de los factores utilizados y se tomó una probabilidad como significativa de $P<0.01$, valor que representa la probabilidad de que la diferencia entre las muestras sea debida al azar.

Notas.

Los reactivos empleados fueron de grado reactivo, a menos que se indique lo contrario. El material de cristalería fue esterilizado en autoclave a 21 libras de presión durante 20 minutos, y posteriormente fue secado en estufa por 30 minutos a 100 °C.

Todas las soluciones utilizadas en el cultivo de tejidos fueron previamente esterilizadas por medio de filtros de poro de 0.22 micras (Millipore, Type GS, U.S.A.).

Los análogos de ceramida, C2-, C8-ceramida y C2-dihidroceramida fueron compradas a Biomol. Parte de la C6-ceramida fue comprada a Matreya y otra parte fue donada generosamente por el Dr. Yusuf Hannun. El ácido okadaico fue obtenido de Sigma.

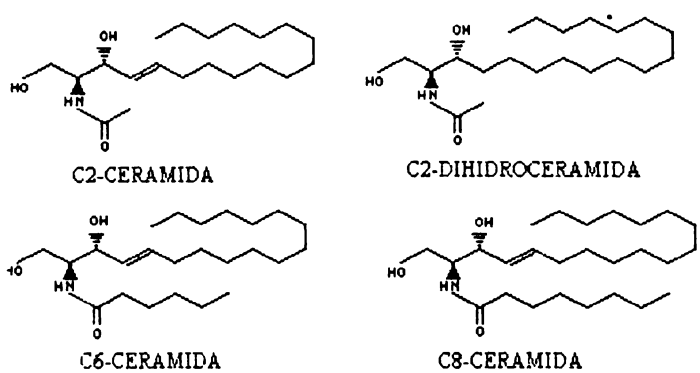
RESULTADOS

LAS C2, C6- Y C8-CERAMIDAS, ANALOGOS SINTETICOS DE LA CERAMIDA, INDUCEN MUERTE EN CELULAS L929-P6 Y L929-CR1 ALTAMENTE SENSIBLES AL EFECTO CITOTOXICO DEL TNF, PERO NO LA DIHIDROCERAMIDA.

Se han realizado numerosos estudios para dilucidar la vía o vías de transducción de la señal citotóxica de TNF, sin que aún sea completamente comprendida. Se ha demostrado en distintos tipos celulares, que en respuesta al tratamiento con TNF se activa una esfingomielinasa, la cual hidroliza esfingomielina generando ceramida y fosfocolina. Esto ha llevado a postular que la ceramida o alguno de sus metabolitos, como la esfingosina o la fosfoceramida podrían servir como posibles mediadores de los efectos producidos por TNF (125). En el presente trabajo se estudió el papel de la ceramida como posible segundo mensajero de la señal citotóxica producida por TNF y la relación de la ceramida con un proteína fosfatasa sensible a ácido okadaico.

FIGURA 7

Estructura de análogos sintéticos de ceramida



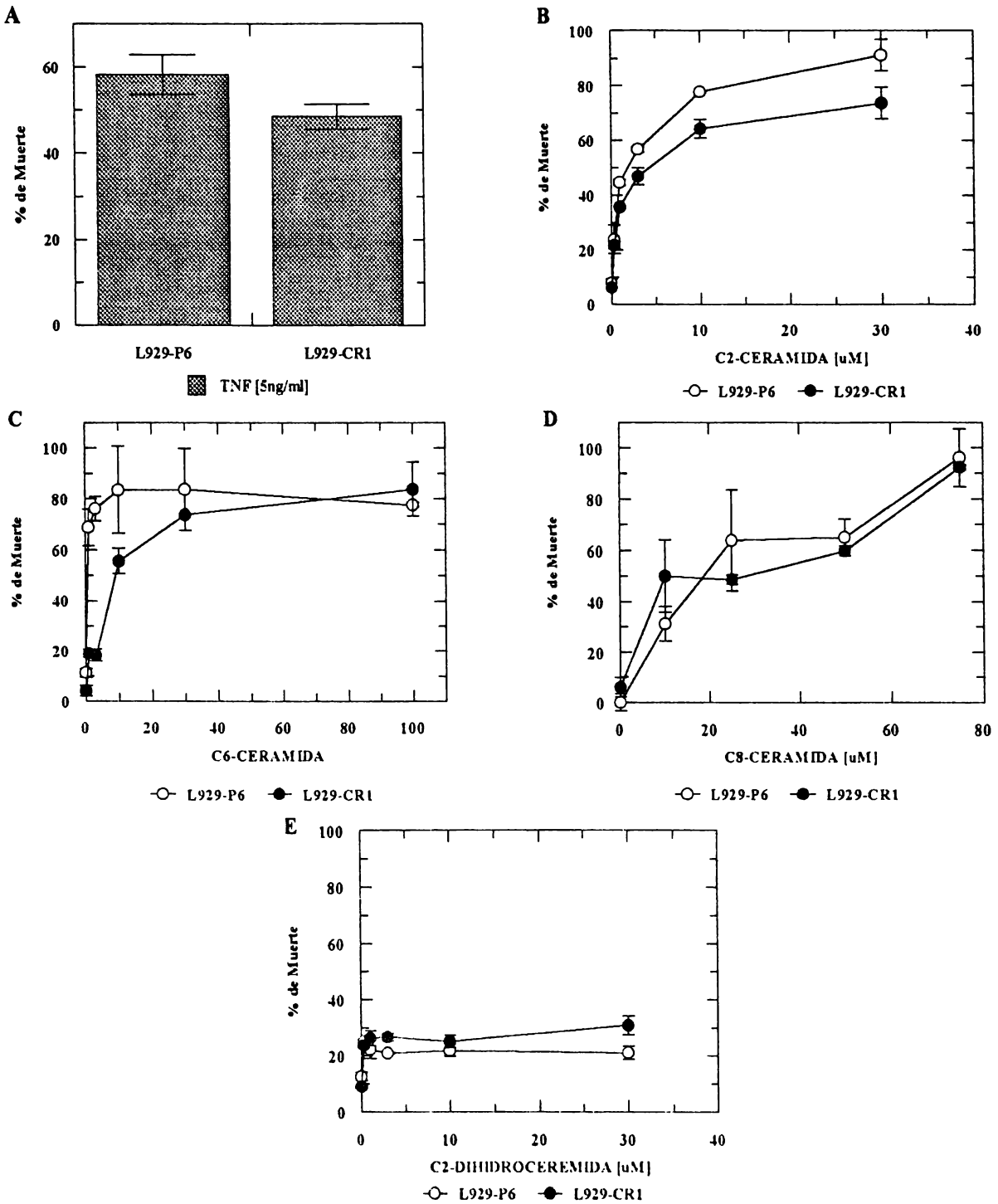
El TNF es capaz de inducir muerte celular en diversas líneas celulares entre las que destaca la línea celular L929. En el laboratorio se subclonó previamente a esta línea celular, de la cual se obtuvieron las clonas L929-P6 y L929-CR1, que son altamente sensibles al efecto citotóxico de TNF. La concentración y el tiempo de incubación con TNF ya habían sido establecidas previamente.

En los experimentos donde se utilizó TNF se empleó la concentración (5ng/ml) y el tiempo de incubación (48 hrs) previamente establecidos en el laboratorio, el porcentaje de muerte fue evaluado por liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. El porcentaje de muerte inducido por TNF en las clonas L929-P6 y L929-CR1 fue de 58% y 52% de muerte respectivamente (Fig. 8A y 9C).

Si la ceramida o alguno de sus metabolitos son el segundo mensajero del TNF, la ceramida debe provocar efectos similares a los producidos por TNF. Para corroborar que la ceramida es mediador del efecto citotóxico producido por TNF, se realizaron curvas dosis-respuesta con varios análogos de ceramida que poseen ácidos grasos con cadenas de 2, 6 y 8 átomos de carbono (C2, C6 y C8-ceramida). Las ceramidas endógenas contienen ácidos grasos de 16 carbonos, lo que las hace insolubles por adición exógena; por el contrario, la presencia de ácidos grasos de cadena corta presentes en las ceramidas sintéticas les confiere permeabilidad a la membrana plasmática (Fig. 7). Se evaluó la muerte inducida por los análogos de cadena corta en dos clonas de L929-P6 y L929-CR1 por medio de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Se encontró que los análogos C2, C6 y C8-ceramida son capaces de inducir muerte a medida que se aumenta la concentración. En P6 y CR1 la C2-ceramida induce un 57% y 46% de muerte a una concentración de 3 μM (Fig. 8B y 9D); la C6-ceramida induce un 83.6% y 55.6% de muerte respectivamente a una concentración de 10 μM (Fig. 8C y 9E). La C8-ceramida también es capaz de producir muerte en ambas clonas a una concentración de 25μM, induciendo un 64% de muerte en la P6 y en la clona CR1 49% ($P \leq 0.02$) (Fig. 8D).

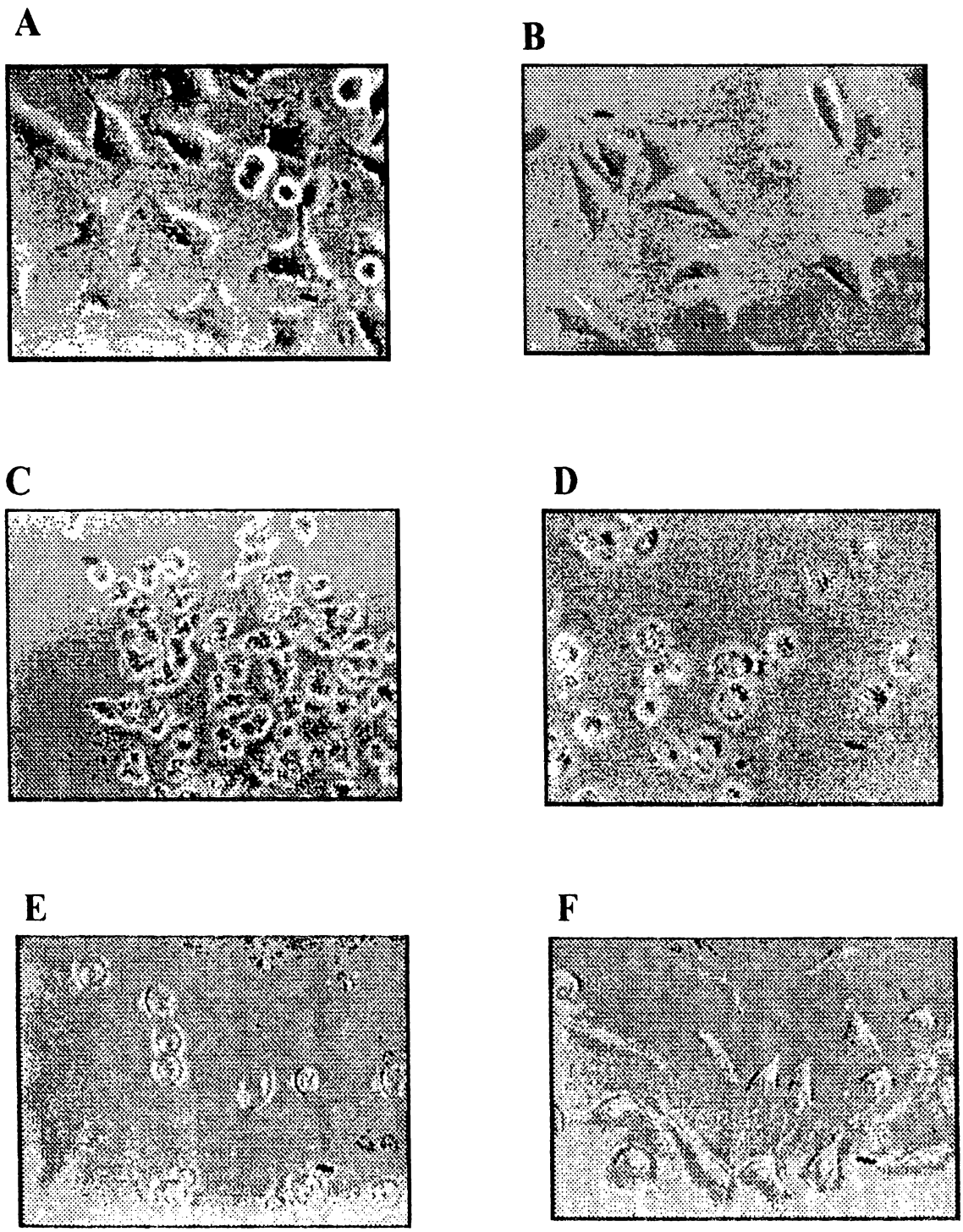
Para determinar la especificidad del efecto de los análogos de ceramida se adicionó C2-dihidroceramida, la cual sólo difiere de la ceramida en la perdida del doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del esqueleto de esfingosina. La C2-dihidroceramida no fue capaz de inducir una muerte similar a la observada con los otros análogos de ceramida utilizados. La clona L929-P6 llegó a un 21% de muerte, mientras que la clona L929-CR1 alcanzó apenas un 27% de muerte (Fig. 8E y 9F).

FIGURA 8
EFECTO CITOTOXICO DE C2, C6, C8-CERAMIDA y C2-DIHIDROCERAMIDA EN CELULAS L929-P6 Y L929-CR1.



Se sembraron 20 000 células/cm^2 de la clona L929-P6 y 10 000 células/cm^2 de la clona L929-CR1 en placas de 48 pozos. Se adicionaron concentraciones crecientes de C6- y C8-ceramida. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 24 hrs de incubación con C2-, C6-, C8-ceramida o C2-dihidroceramida. Los resultados son un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

FIGURA 9
EFECTO CITOTOXICO DE TNF, C2-, C6- Y C2-DIHIDROCERAMIDA

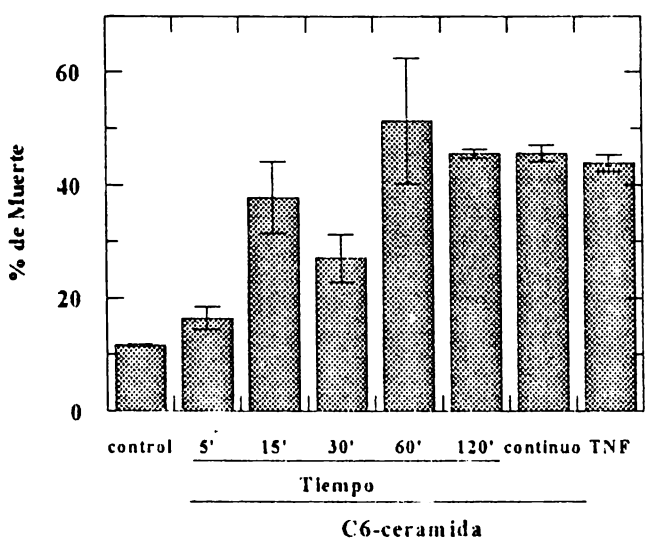


Se sembraron 20 000 células/cm^2 de la clona L929-P6. A) Control, B) 0.5% de etanol absoluto, utilizado como vehículo, C) 5ng/ml de TNF, D) 3μM de C2-ceramida, E) 10μM de C6-ceramida, F) 3μM de dihidroceramida. Las imágenes corresponden a cultivos después de 48 hrs de incubación con TNF y 24 hrs de incubación con C2-, C6-, y C2-dihidroceramida.

LA EXPOSICION TRANSITORIA A CERAMIDA SINTETICA DESENCADENA UNA SEÑAL CITOTOXICA.

Si el supuesto incremento de los niveles de ceramida endógena es un evento transitorio y esto es suficiente para desencadenar la señal citotóxica producida por TNF, la exposición a C6-ceramida durante periodos cortos de tiempo deben poder desencadenar dicha señal. Se diseñaron experimentos en los cuales se trataron a las células con C6-ceramida por 5, 15, 30, 60 y 120 minutos, evaluándose la muerte inducida en células L929-P6 después de 24hrs, medida como el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Los resultados mostraron que 5 minutos de incubación con C6-ceramida provocan un 16% de muerte y que el porcentaje de muerte se va incrementado a medida que se aumentó el tiempo de exposición. Con 60 minutos de incubación con C6-ceramida se alcanzó un 51% de muerte. Este tiempo fue suficiente para generar un efecto citotóxico similar al obtenido por una exposición continua de 24 hrs con C6-ceramida o 48 hrs con TNF. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los 15 y 30 minutos de exposición a C6-ceramida (Fig. 10). Estos resultados apoyan la hipótesis de que un aumento transitorio de ceramida es suficiente para desencadenar la señal citotóxica de TNF.

FIGURA 10
EFECTO DE PULSOS CORTOS DE C6-CERAMIDA EN LA SOBREVIVENCIA DE L929-P6.



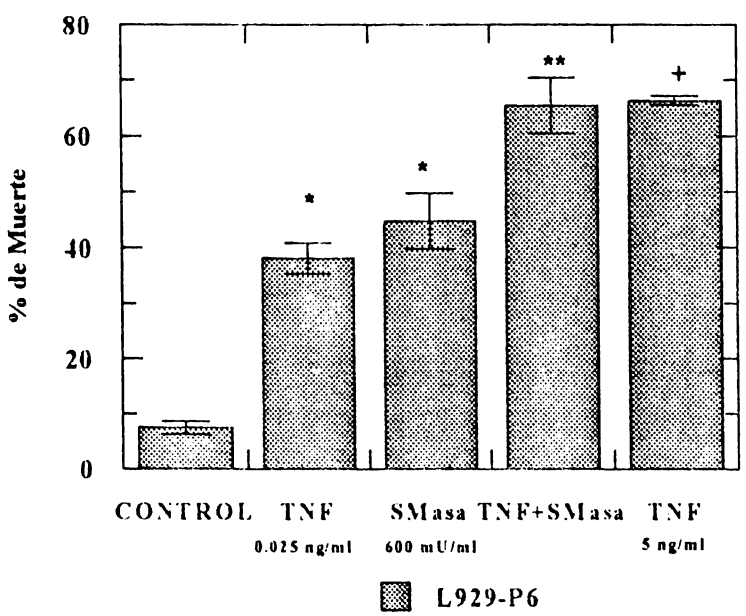
Se sembraron 20 000 células/cm^2. Se adicionó C6-ceramida, durante periodos de 5, 15, 30, 60, 120 min y por 24 hrs de manera continua. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 24 hrs. Los resultados son un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

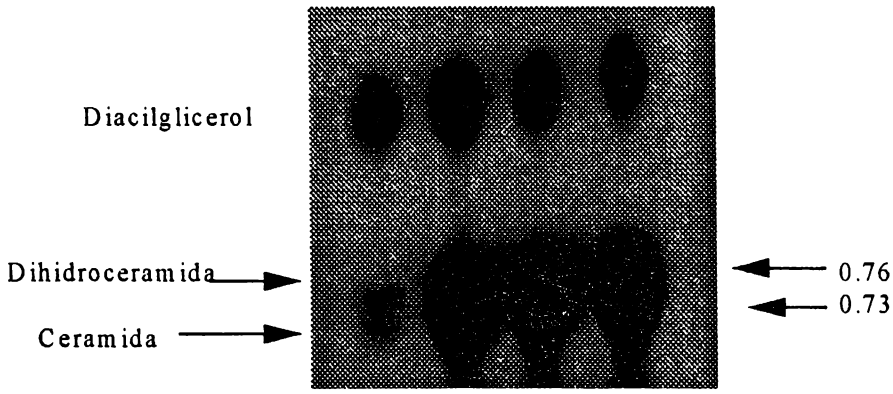
LA ESFINGOMIELINASA INDUCE UNA MUERTE SIMILAR A LA PRODUCIDA POR TNF.

Es conocido que TNF es capaz de activar una esfingomielinasa, la cual puede generar ceramida, como supuesto segundo mensajero, a partir de esfingomielina. Si esto es cierto, la producción endógena de ceramida por adición exógena de esfingomielinasa, debería producir una muerte similar a la observada por el TNF. La adición de 600 mU de esfingomielinasa de *Bacilus cereus*, produjo un 45% de muerte ($P \leq 0.02$). Este porcentaje de muerte es muy similar al obtenido con una concentración baja de TNF (0.025ng/ml), la cual produce un 39% de muerte ($P \leq 0.01$). La adición simultánea de 600 mU de esfingomielinasa y 0.025 ng/ml de TNF producen un 65% de muerte ($P \leq 0.005$), que es muy similar a la muerte inducida por TNF a 5ng/ml (64%, $P \leq 0.0001$), esta concentración es la que normalmente se utiliza en los ensayos de muerte en células L929 (Fig.11A). Para corroborar que la adición de esfingomielinasa realmente esta produciendo un incremento en los niveles de ceramida endógena, se midió la cantidad de ceramida producida por acción de la esfingomielinasa. Los resultados mostraron que 600 mU de esingomielinasa de Bacilus cereus produce un incremento gradual y llega a un máximo de cinco veces a los 60 minutos de tratamiento con la enzima (Fig. 11B).

FIGURA 11
EFECTO CITOTOXICO DE ESINGOMIELINASA EN CELULAS L929-P6

A





Tiempo (min)	0	15	30	60
Ceramida (Incremento sobre la basal).	1	2.8	4.2	5.0

A. Se sembraron 20 000 células/cm^2. Se adicionaron 0.025ng/ml de TNF, 600 mU de esfingomielinasa de *Bacilus cereus*, 0.025 ng/ml de TNF + 600 mU de esfingomielinasa de manera simultánea o 5 ng/ml de TNF. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 48 hrs. Los resultados son un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados por duplicado. * ($P \leq 0.01$ y 0.02) con respecto a TNF+SMasa (Esfingomielinasa), ** ($P \leq 0.005$) y + ($P \leq 0.0001$) con respecto al control.
B. Las células L929-P6 fueron sembradas a 20 000 células/cm^2 y tratadas con 600 mU/ml de esfingomielinasa de *Bacilus cereus* durante 15, 30 y 60 min. A estos tiempos de incubación se realizó una extracción orgánica como se describe en materiales y métodos; los extractos fueron sometidos a un ensayo de diglicérido cinasa en presencia [^{32}P-γ] ATP. La ceramida fosfato fue separada mediante cromatografía en capa fina y se cuantificó por la cantidad de marca incorporada utilizando el sistema de STORM (Molecular dynamics). La movilidad relativa (rf) de cada banda de ceramida aparece a la derecha de la figura.

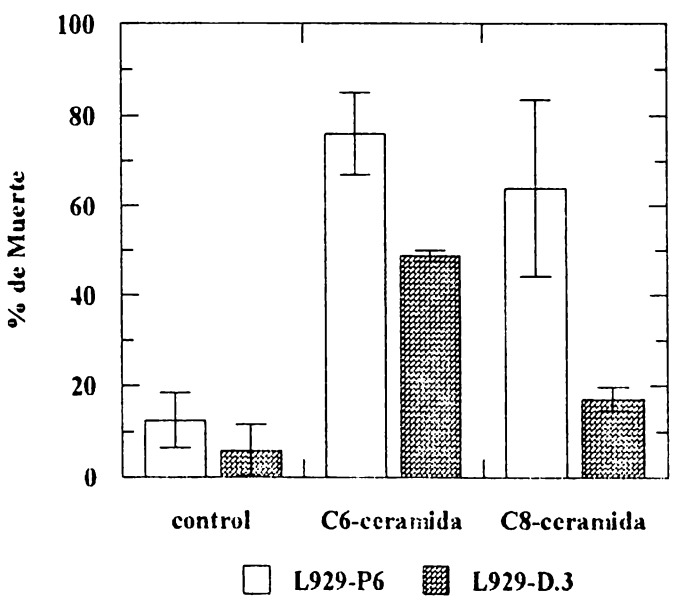
CELULAS RESISTENTES AL EFECTO CITOTOXICO DE TNF, EN EL ESTUDIO DE LA MUERTE MEDIADA POR CERAMIDA.

En nuestro laboratorio se generaron previamente diferentes clonas de L929 resistentes al efecto citotóxico de TNF. La clona L929-D.3, fue obtenida mediante la transfección estable del cDNA de la proteína Bcl-2 a la clona L929-P6 (154). Se ha reportado que la proteína Bcl-2 es un regulador negativo de la apoptosis inducida por diversos factores, entre los que se encuentra el TNF. Otra clona resistente al TNF es la clona L929-EE29, que fue generada mediante mutagénesis química a partir de la clona L929-CR1 y resultó ser resistente al efecto citotóxico de TNF. Estas dos clonas fueron utilizadas para ver el efecto de los análogos sintéticos de ceramida sobre la muerte celular.

LA SOBREEXPRESION DE Bcl-2 INHIBE PARCIALMENTE LA MUERTE INDUCIDA POR ANALOGOS DE CERAMIDA

Si la ceramida forma parte de la señal citotóxica desencadenada por TNF y esta es inhibida en células que han sido transfectadas con el cDNA de la proteína Bcl-2, el efecto citotóxico inducido por ceramida también debiera ser inhibido en células transfectadas con Bcl-2. Bajo esta premisa, se probó el efecto de los análogos sintéticos de ceramida en la clona L929-D.3. Los resultados mostraron que en células L929-D.3 tratadas 10 μM de C6-ceramida, el porcentaje de muerte se disminuye a un 48%, comparado con el 76% inducido en la clona L929-P6, de la cual se derivó la clona L929-D.3. El tratamiento de L929-D.3 con 25 μM de C8-ceramida, mostró un comportamiento similar al observado con C6-ceramida, siendo el efecto citotóxico de 17%, comparado con el 64% inducido en la clona silvestre (Fig. 12). Con estos resultados podemos inferir que la protección producida por la proteína Bcl-2 a la muerte inducida por TNF, también proporciona protección contra la muerte mediada por ceramida, y apoya la hipótesis de que este esfingolípido es un segundo mensajero de TNF.

FIGURA 12
EFECTO DE C6 y C8-CERAMIDA EN CELULAS TRANSFECTADAS CON Bcl-2.

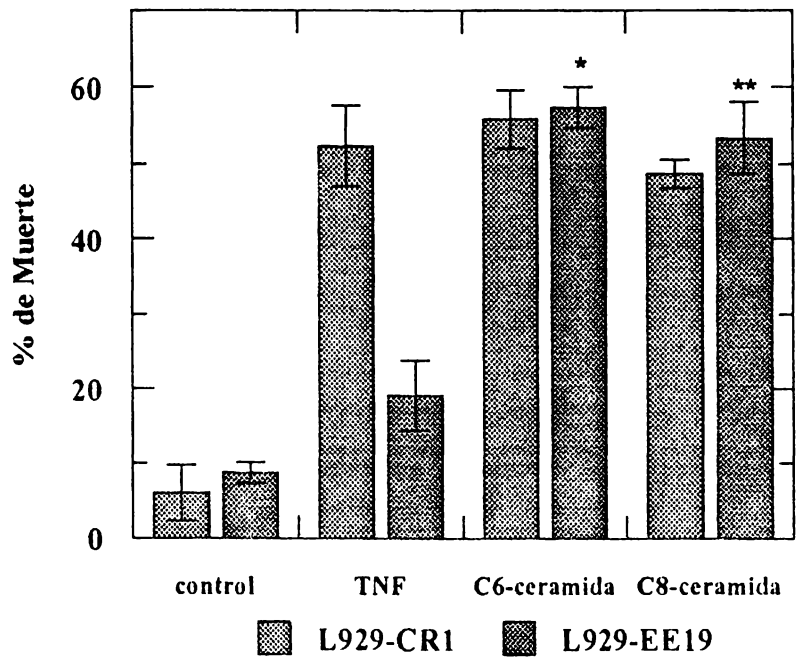


Se sembraron 20 000 células/cm^2. Se adicionó 10 μM de C6-ceramida y 25 μM de C8-ceramida por 24 hrs. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 24 hrs. Los resultados son un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

IDENTIFICACION DE UNA CLONA RESISTENTE AL EFECTO CITOTOXICO DE TNF, PERO SENSIBLE A CERAMIDA.

Se probó el efecto de los análogos de ceramida sobre la clona L929-EE29, generada por mutagénesis química, que es resistente al efecto citotóxico de TNF. El tratamiento de la clona L929-EE29 con 10μM de C6-ceramida produjo un 58% de muerte ($P \leq 0.001$), valor que fue muy similar al inducido en la clona L929-CR1. Por otra parte, el tratamiento con 25μM de C8-ceramida produjo un 77% de muerte ($P \leq 0.008$), que también fue muy similar a lo obtenido con la clona L929-CR1. Esta clona que es resistente al efecto de TNF resultó ser altamente sensible al efecto citotóxico de los análogos de ceramida (Fig. 13).

FIGURA 13
EFECTO DE C6- y C8-CERAMIDA EN CELULAS L929-EE29, RESISTENTES A TNF, PRODUCIDAS MEDIANTE MUTAGENESIS QUIMICA.

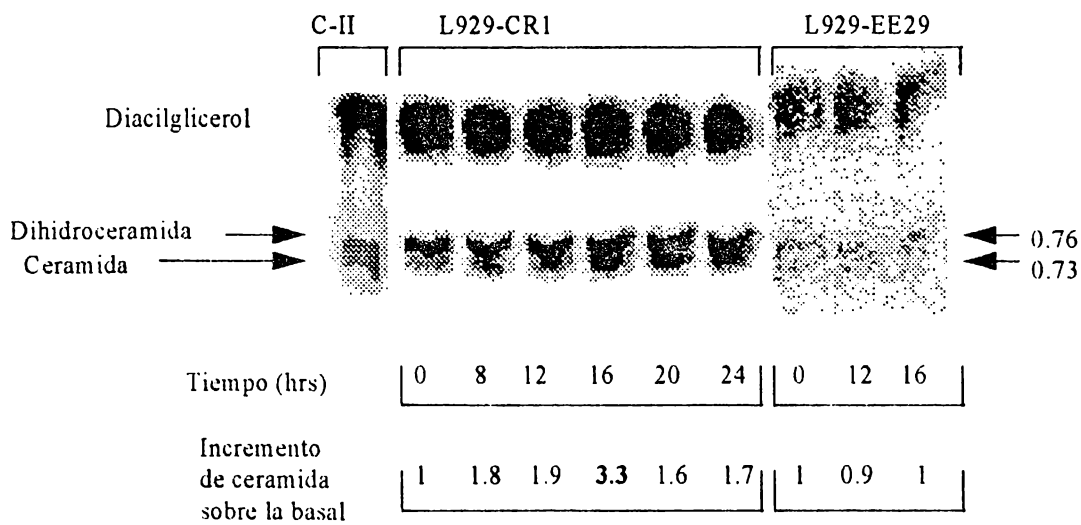


Se sembraron 10 000 células/cm^2 Se adicionaron 5 ng/ml de TNF, 10 μM de C6-ceramida y 25 μM de C8-ceramida. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 48 hrs para TNF y 24 hrs para los análogos de ceramida. Los resultados son un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * ($P \leq 0.001$) y ** ($P \leq 0.008$) con respecto al control.

EL TRATAMIENTO CON TNF INCREMENTA LA CERAMIDA ENDOGENA EN CELULAS SENSIBLES, PERO NO EN CELULAS RESISTENTES.

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la adición de análogos sintéticos de ceramida pueden reproducir la muerte al igual que TNF. Sin embargo, es necesario determinar si el tratamiento con TNF realmente produce un incremento en los niveles de ceramida endógenos. Por lo anterior, se midieron los niveles de ceramida endógena en extractos de lípidos totales de células de la clona L929-CR1, que es sensible tanto a TNF como a ceramida y de la clona L929-EE29 que es resistente a TNF y sensible a los análogos sintéticos de ceramida. Los resultados mostraron que la clona L929-CR1, sensible a TNF, incrementa sus niveles de ceramida endógena de manera transitoria. El aumento es gradual, llegando a un máximo de 3.3 veces el nivel basal después de 16 hrs de tratamiento con TNF (5ng/ml) y después vuelve a disminuir. La clona L929-EE29 no mostró un incremento en sus niveles basales de ceramida a las 12 y 16 hrs de tratamiento con TNF (Fig. 14).

FIGURA 14
NIVELES DE CERAMIDA ENDOGENA EN CELULAS L929-CR1 Y L929-EE29 TRATADAS CON TNF.



Las células L929-CR1 fueron sembradas a 10 000 células/cm^2 y tratadas con 5ng/ml de TNF durante 8, 12, 16, 20 y 24 hrs. Las células L929-EE29 se sembraron a 7000 células/cm^2, se incubaron con 5ng/ml de TNF por 8, 12 y 16 hrs. A estos tiempos de incubación se realizó una extracción orgánica como se describe en materiales y métodos; los extractos fueron sometidos a un ensayo de diglicérido cinasa en presencia [^{32}P-γ] ATP. La ceramida fosfato fue separada mediante cromatografía en capa fina y se cuantificó por la cantidad de marca incorporada utilizando el sistema de STORM (Molecular dynamics). La movilidad relativa (rf) de cada banda de ceramida aparece a la derecha de la figura.

EL ACIDO OKADAICO, UN INHIBIDOR DE PROTEINAS FOSFATASAS 2A RETRASA LA MUERTE INDUCIDA POR TNF y ANALOGOS DE CERAMIDA.

Recientemente se ha propuesto que entre las enzimas activadas por el TNF se encuentra una proteína fosfatasa del tipo 2A (119, 120, 122). Estudios *in vitro* han mostrado que los análogos sintéticos de ceramida, así como la ceramida endógena, pero no otros esfingolípidos relacionados también activan a la proteína fosfatasa 2A (119). También se ha propuesto que esta proteína fosfatasa posee un sitio de unión a ceramida en su subunidad catalítica.

ACIDO OKADAICO RETRASA LA MUERTE INDUCIDA POR TNF.

Si en la señal citotóxica desencadenada por el TNF participa una proteína fosfatasa que puede ser activada por ceramida, la adición de un inhibidor de fosfatasas como el ácido okadaico (AO), debe interferir con la muerte inducida por TNF. Para poner a prueba esta hipótesis se adicionó AO dos horas antes de la adición de TNF, evaluándose el efecto sobre la liberación de lactato deshidrogenaba a las 48hrs. Los resultados mostraron que el AO, por si mismo, es ligeramente tóxico para las células y que este efecto aumenta de manera dosis-dependiente. En la clona L929-P6, la concentración más baja de AO utilizada (0.01nM) produjo un 8% ($P \leq 0.44$) de muerte y la más alta (1 nM) produjo un 30% ($P \leq 0.00003$). En la misma clona, la adición de diferentes concentraciones de AO previa a la adición de 5ng/ml de TNF provocó una disminución en el porcentaje de muerte: 0.001 nM de AO produjo la menor disminución de muerte, bajando de 51% a 33% ($P \leq 0.007$), mientras que la concentración de 1 nM produjo una disminución de 51% a 34% ($P \leq 0.003$); este valor fue muy similar al 30% obtenido con AO solo (Tabla 4). La clona L929-CR1 mostró una mayor sensibilidad al efecto tóxico del AO; a 0.01 nM de AO, en este caso se produjo un 28% de muerte comparado con el 11% para la clona L929-P6. Sin embargo, la adición de AO previa a TNF también provocó una disminución en el porcentaje de muerte de 50% a 39% ($P \leq 0.01$). (Tabla 4). Estos resultados sugieren que una proteína fosfatasa sensible al AO participa en la señal citotóxica desencadenada por TNF.

En diversos sistemas de muerte celular la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 aumenta la viabilidad celular. Con el fin de estudiar la relación entre la muerte celular mediada por TNF y la protección que confiere Bcl-2 se utilizó la clona L929-D.3 que sobreexpresa Bcl-2 (154). Si la protección al efecto citotóxico de TNF producida por Bcl-2 es posterior a la ceramida, con AO no debería haber mayor protección de la ya observada en las células transfectadas con Bcl-2. Para explorar esta posibilidad, se trataron células L929-D.3 con 0.01nM de AO dos horas antes de la

adición de TNF. Los resultados mostraron que la adición previa de AO no aumentó la viabilidad comparada con la que ya se tenía con la transfección con Bcl-2. El porcentaje de muerte producido fue de 30% tanto en células tratadas con TNF como en las tratadas con AO y TNF (Tabla 4).

TABLA 4

EFECTO DE ACIDO OKADAICO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR TNF EN CELULAS L929-P6 y L929-CR1.

Clona de L929	Acido okadaico (nM)	TNF -α	
		-	+
P6 (Sensible a TNF)	0	8±3.9	51±7.37
	0.001	8±1.8	33±1.63
	0.01	11±0.9	33±4.43
	0.1	18±2.3	25±6.00
	1	30±5.0	34±7.10
CR1 (Sensible a TNF)	0	10±5.55	50±4.78
	0.01	28±5.60	39±4.93
D.3 (Resistente a TNF)	0	12±1.41	29±5.48
	0.01	21±2.41	30±4.08
EE29 (Resistente a TNF)	0	9±2.30	26±7.42
	0.01	23±7.30	28±8.38

Se sembraron 20 000 células/cm^2 de las clonas L929-P6 y L929-D.3 y 10 000 células/cm^2 de las clonas L929-CR1 y L929-EE29. Dos horas antes de adicionar 5ng/ml de TNF se pusieron las diferentes concentraciones de ácido okadaico indicadas. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

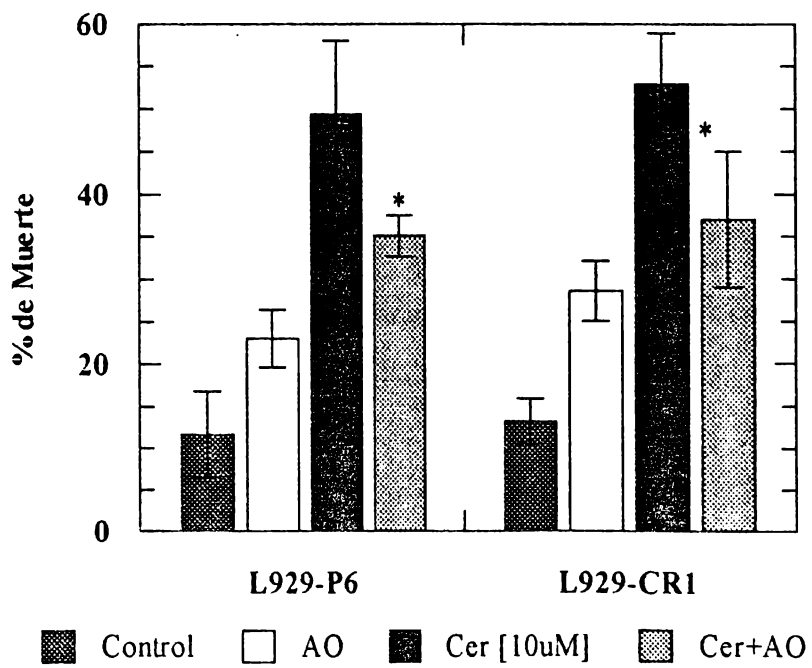
La clona L929-EE29, muestra una resistencia parcial al efecto citotóxico de TNF al disminuir la liberación de lactato deshidrogenasa de 50% en la clona L929-CR1a 26%, con una $P \leq 0.003$. El tratamiento con AO produjo un 23% de muerte, este valor es muy similar al obtenido con TNF y TNF + AO (Tabla 4).

ACIDO OKADAICO INTERFIERE CON LA MUERTE INDUCIDA POR ANALOGOS DE CERAMIDA.

Los resultados anteriores no permiten decir si la protección que confiere el AO contra la muerte inducida por TNF, también puede interferir con la muerte inducida por los análogos sintéticos

de ceramida. Para evaluar si el AO también puede interferir con la muerte mediada por ceramida, se adicionó 0.01 nM de AO dos horas antes de poner 10μM de C6-ceramida a las clonas L929-P6 y CR1. En la clona L929-P6, la adición previa de AO produjo una disminución de 53% al 37% ($P \leq 0.01$) en el porcentaje de muerte inducido por C6-ceramida. La clona CR1 mostró un comportamiento similar a la clona L929-P6, la adición previa de AO produjo una disminución de la muerte inducida por análogos de ceramida de 50% a 35% ($P \leq 0.01$) (Fig. 15). El hecho de que AO pueda interferir con la muerte inducida por TNF o ceramida le da fuerza al argumento de la participación de un proteína fosfatasa activable por ceramida en la señal citotóxica desencadenada por TNF.

FIGURA 15
EFECTO DE ACIDO OKADAICO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR C6-CERAMIDA EN CELULAS L929-P6 y L929-CR1.



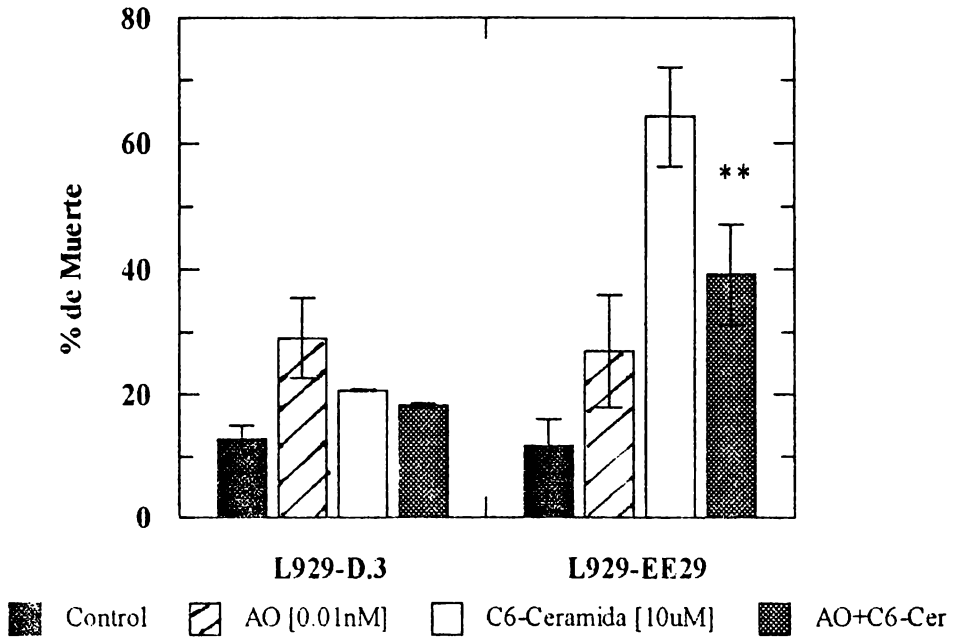
Se sembraron 20 000 células/cm^2 de la clona L929-P6 y 10 000 células/cm^2 de la clona L929-CR1. Dos horas antes de adicionar 5ng/ml de TNF se adicionó 0.01 nM de ácido okadaico. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 24 hrs. * ($P \leq 0.01$) con respecto al control. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

En la clona L929-D.3 que está protegida contra el efecto citotóxico tanto de TNF como de análogos de ceramida, la adición previa de AO a la de análogos de ceramida no debiera conferir mayor protección a la ya observada. Los resultados mostraron que a 24 hrs de cultivo sólo en presencia de AO se produce un 29% ($P \leq 0.07$) de muerte, este porcentaje es similar al que induce la

C6-ceramida (21%, P≤0.05). La adición previa de AO a C6-ceramida produce un porcentaje de muerte muy similar al obtenido con la ceramida sola (18%, P≤0.11) (Fig. 16).

La clona L929-EE29 que es resistente a TNF, pero sensible a C6-ceramida, permite explorar la relación entre la ceramida y la proteína fosfatasa al probar el efecto de AO sobre la muerte inducida por ceramida. Los resultados mostraron que la adición de AO dos horas antes de la adición de C6-ceramida, reduce el porcentaje de muerte de 64% a 39% (P≤0.002) (Fig. 16). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que una proteína fosfatasa que puede ser activada por TNF y ceramida, se encuentra involucrada en el proceso de muerte inducido por ambos.

FIGURA 16
EFECTO DE ACIDO OKADAICO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR C6-CERAMIDA EN CELULAS L929-D.3 y L929-EE29.



Se sembraron 20 000 células/cm^2 de la clona L929-D.3 y 10 000 células/cm^2 de la clona L929-EE29. Dos horas antes de adicionar 10 μM de C6-ceramida se adicionó 0.01 nM de ácido okadaico. La muerte celular se evaluó determinando el porcentaje de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo después de 24 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ** (P≤0.002) con respecto al control.

DISCUSION

El TNF es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, a la cual se le atribuyen múltiples actividades biológicas, entre las que destaca el encendido de un programa de muerte celular, mediado por la activación de dos tipos de receptores (TNFR1 y TNFR2), coexpresados sobre la membrana plasmática de casi todos los tipos celulares (111). Aunque la mayoría de las células coexpresa ambos receptores, se ha reportado que el TNFR1 es el principal responsable de la mayoría de las actividades biológicas del TNF. El mecanismo de transducción de señales de TNF aún no es completamente conocido. Hasta el momento se han descrito diversos eventos bioquímicos tempranos que son desencadenados por este factor; estos eventos incluyen la activación de proteínas cinasas (114, 118, 126), fosfatasas (119), fosfolipasa A2 (155), esfingomielinasas (110, 111), la activación de factores de transcripción, fosforilación de varias proteínas, como las proteínas de choque térmico, Hsp 70 (156), la proteína cinasa activada por mitógenos, MAPK (157) y la fragmentación internucleosomal del DNA (129).

En los últimos años se ha involucrado a los esfingolípidos, especialmente a la ceramida, como posibles mediadores de los efectos producidos por el TNF. En diversos tipos celulares, se ha demostrado que el tratamiento con TNF produce un recambio en la esfingomielina (113), la cual es hidrolizada por medio de una esfingomielinasa generando ceramida como supuesto segundo mensajero. Por otra parte, la adición exógena de análogos sintéticos de ceramida permeables a la membrana plasmática han podido mimetizar algunos de los efectos producidos por el TNF, como es la inducción de la diferenciación en células promielocíticas HL-60 y la inducción de fragmentación internucleosomal del DNA, como marcador típico de la apoptosis, en células U937 (146, 158).

El mecanismo por el cual el TNF desencadena la señal de muerte aún no se comprende por completo, por lo que, el presente trabajo pretendió valorar el papel de la ceramida como supuesto segundo mensajero de la señal citotóxica de TNF. La línea celular de fibrosarcoma murino L929 es sensible al efecto citotóxico de TNF, por lo que es un buen prototipo para estudiar la muerte mediada por este factor. En el laboratorio, la línea celular L929 fue previamente subclonada, obteniéndose dos clonas altamente sensibles al efecto citotóxico de TNF, L929-P6 y L929-CR1 (154).

Análogos de ceramida producen una muerte similar a TNF.

Existen varias evidencias que muestran que la muerte inducida por TNF y la muerte inducida por adición exógena de ceramida siguen mecanismos similares. En ciertos tipos celulares, se ha reportado que análogos sintéticos de ceramida permeables a la membrana plasmática son capaces de mimetizar algunos de los efectos producidos por el TNF. Por ejemplo, C2-ceramida es capaz de inducir fragmentación internucleosomal del DNA en células U937 de manera similar al TNF (129). Por esta razón, el primer paso para analizar si la ceramida puede ser el segundo mensajero de la señal citotóxica desencadenada por TNF, se adicionaron tres diferentes análogos sintéticos de ceramida, C2, C6, y C8-ceramida (Fig. 7); estos fueron capaces de inducir muerte celular de manera dosis-dependiente en las clonas L929-P6 y L929-CR1 (Figura 8). La C2-ceramida produjo un 50% de muerte celular con una concentración de 3μM en ambas clonas, esta concentración es tres veces menor a la concentración de C6-ceramida requerida para obtener resultados similares y 8 veces menor a la de C8-ceramida. A diferencia de C2 y C6-ceramida, la muerte inducida por C8-ceramida presenta un comportamiento que tiende hacia a la linearidad.

Es conocido que las ceramidas naturales poseen ácidos grasos de 16, 18 y 22 carbonos, lo que los hace altamente hidrofóbicos previniendo su solubilización para poder ser adicionados de manera exógena. Esta dificultad ha sido superada por síntesis orgánica, acortando las cadenas de ácidos grasos, con un consecuente aumento en su solubilidad (159).

Estudios en células HL-60, tratadas con 3μM de C2-ceramida marcada isotópicamente, mostraron que un 90 % de ésta se incorpora a la célula en los primeros 10 minutos. Cabe hacer notar que si se utiliza a la C2-ceramida en presencia de suero, su capacidad para penetrar la membrana e incorporarse a la célula disminuye notablemente (159). Por otra parte, se ha reportado que la C6-ceramida tiene un mejor efecto si se mezcla estequiométricamente con albúmina (Comunicación personal de la Dra. Alieja Bielawska). Estos resultados muestran que un elemento importante para poder observar efectos biológicos de las ceramidas es de su interacción con proteínas que puedan presentarlas a la célula.

Por lo tanto, las diferencias en potencia citotóxica que observamos entre los análogos de ceramida (C2, C6 y C8-ceramida, Figura 8) pueden deberse a diferencias en la presentación de estas moléculas lipídicas a la célula y a la facilidad con que puedan atravesar la membrana plasmática.

La muerte inducida por TNF y los análogos de ceramida es similar.

Un fenómeno que se ha considerado como marcador característico de la muerte por apoptosis es la fragmentación internucleosomal del DNA, que puede ser inducida por TNF y otros factores (29-31). En las células L929-P6 el tratamiento con 5ng/ml de TNF por 24 hrs no fue capaz de inducir esta fragmentación (Apéndice 2A). Como control positivo de fragmentación se emplearon las células promielocíticas HL-60 en las que se observó que un tratamiento con 1000ng/ml de TNF por 6 hrs producía una escalera de fragmentación, como ya se había reportado previamente (158). Un estudio reciente muestra fragmentación de DNA en células L-929 cuando son tratadas con 300ng/ml de TNF (155). Estos resultados reflejan que la fragmentación de DNA, como marcador de la muerte apoptótica puede ser inducida por TNF en células L-929. Sin embargo, estos reportes también ponen de manifiesto que este fenómeno requiere de concentraciones de TNF (1000 y 300ng/ml, equivalente a 59 nM y 17.5 nM) que están muy por encima de la Kd de los receptores, que se encuentra en el rango de 0.3 a 30pM. Se ha propuesto que el requerimiento de concentraciones bajas de ligando sólo una pequeña fracción de la población celular presenta esta fragmentación y que la adición de concentraciones sobresaturantes recluta un mayor número de células a este proceso.

Se ha reportado en células HL-60, que la C8-ceramida es capaz de producir una fragmentación de DNA similar al TNF. En un estudio con células L929, la C2-ceramida no fue capaz de inducir la fragmentación de DNA a diferencia del TNF que si lo indujo (155). El que el TNF produzca fragmentación de DNA, mientras que la C2-ceramida no, puede deberse a que este fenómeno ocurra en una pequeña subpoblación, similar a lo que se observamos a bajas concentraciones de TNF y con los análogos de ceramida (Fig. 17).

Otros estudios realizados en el laboratorio, utilizando las clonas L929-P6 y L929-CR1, han demostrado que el TNF es capaz de inducir un aumento en la reducción de MTT por número de célula viable, lo que se ha interpretado como un aumento en la producción de superóxidos y por tanto de estrés oxidativo. Un aumento similar en la reducción de MTT por célula viable es observado con C6 y C8-ceramida (Apéndice 2B, 154). Las clonas resistentes a TNF utilizadas en este estudio (L929-D.3 y L929-EE29), no presentan este aumento en estrés oxidativo cuando se tratan con TNF. El tratamiento con C6-ceramida produjo un aumento en el estrés oxidativo en la clona L929-EE29, que es resistente a TNF, pero sensible a ceramida.

Todos estos resultados dan evidencias de que la muerte inducida por TNF y por los análogos de ceramida utilizan mecanismos similares y esto sugiere que la ceramida o algunos de sus

metabolitos podrían estar involucrados en la señal citotóxica desencadenada por TNF en células L929.

C2-dihidroceramida no induce muerte celular como ceramida o TNF

El estudio de los lípidos como segundos mensajeros, en especial de la ceramida, ha estado sujeto a discusión, debido a que se trata de moléculas anfipáticas y que forman una parte estructural de la membrana. Se ha argumentado que los efectos producidos por la ceramida podrían deberse a que esté funcionando como detergente y no como una molécula mensajera/efectora de procesos desencadenados por factores y receptores específicos. La especificidad de la ceramida ha sido previamente estudiada y se ha analizado el efecto de otros esfingolípidos relacionados. Se ha demostrado, que la dihidroceramida a diferencia de la ceramida (Fig. 7), es inactiva y no ha sido capaz de reproducir la diferenciación celular, la fragmentación del DNA o la activación de la proteína fosfatasa 2A dependiente de ceramida (159, 160). Nuestros resultados mostraron que la C2-dihidroceramida tampoco es capaz producir muerte en las clonas L929-P6 y L929-CR1, incluso cuando se adicionaron concentraciones tan altas como 30μM (Fig. 8 y 9). Ya que la única diferencia entre la dihidroceramida y la ceramida es el doble enlace entre los carbonos 4 y 5 (Fig. 7), se ha sugerido que este enlace es esencial para la actividad biológica de la ceramida.

Tratamiento transitorio con C6-ceramida produce la muerte.

En células HL-60, se ha reportado que el tratamiento con TNF, produce la hidrólisis de esfingomielina de manera dosis-dependiente, que va acompañada de la acumulación de ceramida (113, 161). Este incremento de ceramida se ha reportado como un evento transitorio. Una manera de tratar de reproducir un aumento transitorio en la concentración de ceramida es aplicar pulsos de C6-ceramida. Los resultados de la figura 10, muestran que 15 minutos de exposición a 10 μM de C6-ceramida produce un 40% de muerte, y una hora de exposición a C6-ceramida produce un efecto similar a los resultados obtenidos con 24 hrs de exposición continua.

Como ya se había mencionado, los análogos de ceramida con ácidos grasos de cadena corta, pueden atravesar la membrana plasmática. Estudios con células HL-60 demuestran que un 90% de la concentración de C2-ceramida adicionada se incorpora a la célula en los primeros 10 minutos, sin que parezca metabolizarse rápidamente, ya que un 80% de ésta se mantiene aún después de 24 hrs (159). Asumiendo que la C6-ceramida siguiera un comportamiento similar al de la C2-ceramida, puede suponerse que con una hora de exposición se alcanza un nivel intracelular semejante al que se

logra con 24 hrs de exposición. El hecho de que el 20% de los análogos incorporados se metabolicen dentro de la célula no permite descartar que estos análogos ingresen al metabolismo de los esfingolípidos y generen otras moléculas que pudieran estar llevando a cabo los efectos biológicos.

El tratamiento con esfingomielinasa de *Bacilus cerues* produce muerte y este efecto es aditivo a la muerte inducida por bajas concentraciones de TNF.

Se ha reportado que el tratamiento con TNF activa esfingomielinasas intracelulares (84-96, 110). La adición de esfingomielinasa en células HL-60 ha podido mimetizar la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) de manera similar a como lo hace el TNF (162). Adicionamos esfingomielinasa de manera exógena para corroborar si esta puede inducir muerte en células L929 de manera similar a TNF. Los resultados mostraron que 600mU/ml de esfingomielinasa adicionados exógenamente producen una muerte similar a la inducida por 0.025ng/ml de TNF. Interesantemente, cuando se adicionaron estas concentraciones de esfingomielinasa y TNF juntos, se alcanza el efecto máximo de muerte, similar a la producida por 5ng/ml de TNF (Fig. 11A). El tratamiento con 600mU de esfingomielinasa por 30 y 60 minutos produce un aumento de 5 veces en la cantidad de ceramida en las células tratadas (Fig. 11B). A pesar de la magnitud de este aumento en la cantidad de ceramida, el efecto citotóxico que lo acompaña es menor al obtenido con 5ng/ml de TNF o con los análogos sintéticos de ceramida, lo cual podría deberse a que la esfingomielinasa adicionada hidroliza esfingomielina sobre la cara externa de la membrana plasmática, por lo tanto, la ceramida se acumula sobre esta cara de la membrana, lo que dificultaría que la ceramida llegue a sus blancos potenciales localizados en la cara interna de la membrana o en el citosol. Por otra parte, se ha postulado que el TNF puede activar más de un mecanismo por el cual puede inducir muerte (49-62). Por tanto, podría ser que el TNF active más de una vía para producir la muerte celular en la células L929 y que cuando adicionamos la esfingomielinasa se de sólo un estimulo parcial de muerte. Esto explicaría por qué cuando se adicionan la esfingomielinasa y TNF juntos se produce un efecto aditivo en la muerte. Estos resultados demuestran que la simple producción de ceramida no es suficiente para reproducir el efecto citotóxico del TNF, a pesar de que juega un papel importante en la vía de muerte. Otra posibilidad para explicar estos resultados consiste en que la ceramida deba ser producida en sitios específicos de la células y que un aumento indiscriminado fuera de estos sitios no sea capaz de activar a los blancos moleculares correspondientes.

La sobreexpresión de Bcl-2 coincide con protección por muerte mediada por TNF o ceramida.

Se ha encontrado que diversas proteínas son capaces de interferir con la muerte producida por el TNF, las que incluyen inhibidores de cisteil proteasas y la proteína Bcl-2. El uso de clonas resistentes al TNF permite explorar el comportamiento de los posibles segundos mensajeros de esta señal. El papel protector que confiere la sobreexpresión de Bcl-2 en células de origen linfoide deprivadas de factores de crecimiento o tratadas con glucocorticoides, radiación gama, TNF y anti-Fas ha sido claramente demostrado (11, 163). Nuestros resultados muestran que la clona L929-D.3, transfectada con el cDNA de Bcl-2, se encuentra parcialmente protegida de la muerte inducida por TNF (Tabla 4, 154), también se encuentra parcialmente protegida del efecto citotóxico de la C6 y C8-ceramida (Fig. 12). Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la sobreexpresión de Bcl-2 protege de la muerte apoptótica. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión de Bcl-2 también protege de la muerte inducida por H_2O_2 (164). Como ya se mencionó, el TNF produce un incremento en la reducción de MTT por número de célula viable en células sensibles a TNF y ceramida (154), lo que sugiere la inducción de un estrés oxidativo. Por lo tanto, la protección conferida por Bcl-2 a la muerte inducida por ceramida, es un argumento más que apoya la idea de que la ceramida pudiera participar como segundo mensajero en la muerte inducida por TNF.

La clona L929-EE-29, resistente a TNF, es sensible a la muerte inducida por ceramida.

Una manera de estudiar los mecanismos de transducción de señales, es generar células resistentes. Con esta idea en mente, en el laboratorio, se generó la clona L929-EE29 resistente a la muerte inducida por TNF, mediante mutagénesis química (154). El motivo por el cual esta clona es resistente es desconocido. Sin embargo, al probar el efecto de C6 y C8-ceramida resultó que esta clona es sensible a la muerte inducida por ceramida. Esto hace pensar que la mutación producida por la mutagénesis afecta a un elemento de transducción que se encuentra entre el receptor de TNF y la activación de la esfingomielinasa. El hecho de que esta clona sea resistente a TNF y sensible a ceramida, puede ayudar a realizar estudios acerca de los eventos previos y posteriores a la producción de ceramida.

El TNF induce un aumento transitorio en los niveles de ceramida endógena.

Se ha propuesto que la acumulación transitoria de ceramida derivada de la hidrólisis de esfingomielina sirve como un posible mecanismo de transducción de señales de factores como interleucina-1, interferón-γ y TNF (113, 165). La hidrólisis de esfingomielina se ha observado en células que son sometidas a estrés por deprivación de nutrientes y radiación gama (166-167). En células de origen hematopoyético, se ha reportado que existe un incremento en los niveles de ceramida que puede ser observable desde los 15 min., llegando a su máximo después de una hr de tratamiento (113, 161). El tratamiento con TNF también produce un aumento en los niveles de ceramida endógena en células endoteliales humanas (168). Dados estos antecedentes, en este trabajo medimos los niveles de ceramida endógena en células L929 en respuesta a TNF. Los resultados mostraron que la clona L929-CR1 que es sensible al TNF eleva sus niveles de ceramida desde las 8 hrs y que llegan a un máximo de 3.3 veces el nivel basal a las 16 hrs de tratamiento (Fig. 14). Este incremento tardío en los niveles de la ceramida endógena podría explicar la diferencia en los tiempos requeridos para matar a las células L929. Mientras que con TNF la muerte de la mayoría de la población se alcanza a las 48 hrs, con los análogos de ceramida esta se reduce a 24 hrs.

Por otra parte, también estudiamos el efecto de TNF sobre los niveles de ceramida en la clona L929-EE29 (resistente a TNF y sensible a ceramida). Los resultados mostraron que los niveles de ceramida endógena no presentan el incremento observado en la clona L929-CR1 a las 12 y 16 hrs después de ser tratadas con TNF (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la mutación generada en esta clona se encuentra entre el receptor y la activación de la esfingomielinasa.

En la figura 14 también se observa un incremento en los niveles de los que se supone que es fosfodihidroceramida (Comunicación personal de la Dra. Alieja Bielawska). Este incremento puede ser una manera de regular el incremento en los niveles de ceramida, produciendo una molécula no activa a partir de una activa. Se sabe que la adición del doble enlace de la ceramida se da en pasos muy posteriores en la biosíntesis de la ceramida, este retraso en la formación de la ceramida ha sido propuesto como un mecanismo de regulación en la producción de moléculas activas. Por otra parte, una posibilidad interesante para regular los efectos biológicos de la ceramida consistiría en eliminar el doble enlace de la ceramida convirtiendo en dihidroceramida carente de actividad biológica. Este paso es posible ya que esta reacción es reversible *in vivo* (159).

El ácido okadaico, un inhibidor de proteínas fosfatasas 2A, retrasa la muerte inducida por TNF.

Se han realizado numerosos esfuerzos para delinear las rutas dependientes de la vía de los esfingolípidos. Diversos estudios han permitido identificar un patrón complejo de posibles blancos moleculares de la ceramida o alguno de sus metabolitos, los cuales incluyen la activación de una proteína cinasa dependiente de ceramida (114, 126), de una PKC-ζ (104) y de proteínas cinasas activadas por mitógenos (162, 169). Recientemente se identificó una proteína fosfatasa 2A, sensible a AO, en un rango de 1-10nM (119, 120, 122) que puede ser activada *in vitro* con C2-ceramida, por lo cual se le denomina (CAPP, del inglés Ceramide-activated protein kinase). Se ha propuesto, que la CAPP puede ser un blanco molecular importante de la ceramida (170). En células HL-60 se ha reportado que el AO, un potente inhibidor de proteínas fosfatasas, es capaz de inhibir la regulación negativa del proto-oncogen *c-myc* producida tanto por TNF como C2-ceramida (171). Por esta razón estudiamos el efecto de AO sobre la muerte inducida por TNF. Los resultados mostraron que todas las concentraciones utilizadas de AO, protegieron contra la muerte inducida por TNF (Tabla 4). Cabe hacer notar que a pesar de disminuir la concentración de AO hasta 0.01nM, para disminuir el efecto tóxico de este, se mantuvo el mismo nivel de protección observado a mayores concentraciones. Ya que la concentración empleada (0.01nM) está por debajo del rango de concentraciones recomendadas para inhibir proteínas fosfatasas 2A *in vitro*, es posible que el AO estuviera inhibiendo principalmente a CAPP. El efecto tóxico de AO puede explicarse a la posible inhibición de proteínas fosfatasas involucradas en otros procesos vitales de la célula. La adición de AO y TNF a las clonas resistentes no aumentó la protección que manifiestan basalmente estas clonas.

Todos estos resultados en su conjunto apoyan la idea de que una proteína fosfatasa 2A se encuentra involucrada en la transducción de la señal citotóxica de TNF y coincide con las observaciones de que una fosfatasa del tipo 2A (CAPP) puede ser activada *in vitro* por análogos de ceramida como los que se emplearon en este estudio.

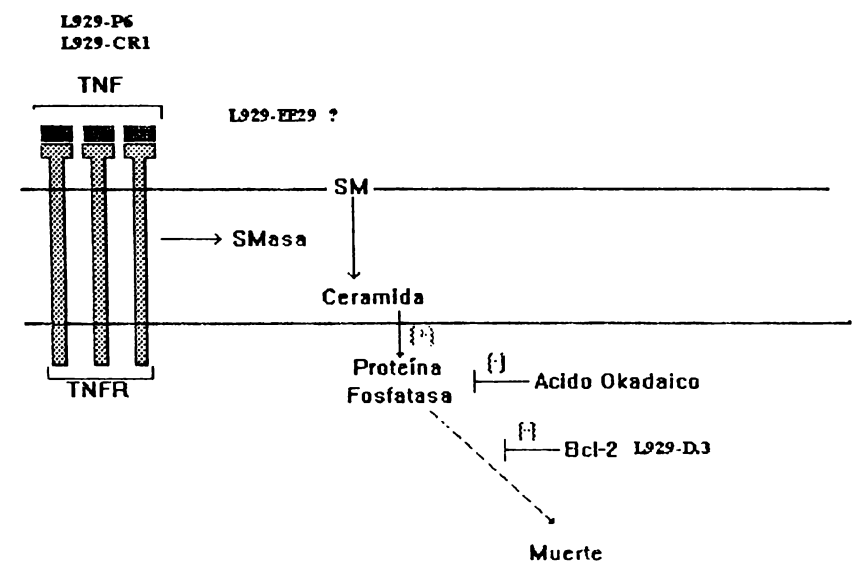
El ácido okadaico también retrasa la muerte inducida por ceramida.

Aunque se ha demostrado que la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A posee un sitio de unión a ceramida (122), los resultados de inhibición por el AO de la muerte inducida por TNF, no permiten decir si el AO también inhibe la muerte inducida por ceramida. Para lo cual también estudiamos el efecto del AO sobre la muerte inducida por ceramida. Los resultados mostraron que las clonas que son sensibles a ceramida, se protegen de esta al ser pretratadas con AO (Fig. 15). El AO no confiere mayor protección a la clona L929-D.3 del que le confiere la

sobreexpresión de Bcl-2 contra la muerte producida por ceramida. Más aún, el hecho de que el AO proteja a la clona L929-EE29 de la muerte inducida por ceramida da más fuerza a la hipótesis de que la mutación que le confiere resistencia al TNF a esta mutante se encuentra entre el receptor y la activación de la esfingomielinasa (Fig. 16). Además, el uso de la clona L929-EE29 fue muy importante porque a través de ella se pone de manifiesto de manera indirecta la existencia de una fosfatasa inducible por ceramida cuya activación se puede asociar a la muerte celular.

Todos estos resultados en conjunto nos dan indicios de que la ceramida o alguno de sus metabolitos pueden estar involucrados en la señal citotóxica desencadenadas por TNF (Fig. 17).

FIGURA 17
EVENTOS QUE PARTICIPAN EN LA SEÑAL CITOTOXICA DESENCADENADA POR TNF EN CELULAS L929.



TNF Factor de Necrosis Tumoral
TNFR Receptor de TNF
SMasa Esfingomielinasa
SM Esfingomielina

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se valoró el papel de la ceramida como posible segundo mensajero de la señal citotóxica desencadenada por el TNF. Varios de los hallazgos de este trabajo dan fuerza a la hipótesis de que la ceramida y/o alguno de sus metabolitos pueden servir como posibles segundos mensajeros del TNF.

1. Los análogos de ceramida adicionados exógenamente pueden inducir muerte celular y estrés oxidativo similar al producido por el TNF.
2. El aumento en los niveles de ceramida endógena en respuesta al TNF en células sensibles a este factor.
3. Clonas resistentes al efecto citotóxico del TNF no presentan este aumento en los niveles de ceramida endógena en respuesta a TNF.
4. La clona L929-EE29 resistente al efecto citotóxico de ceramida resultó sensible al efecto citotóxico de los análogos sintéticos de ceramida.

Por otra parte, la protección que el AO confiere contra la muerte inducida por TNF o la ceramida sugiere la existencia de una proteína fosfatasa activada por ceramida que participa en el programa de muerte. Hay dos elementos que merecen ser atendidos con respecto al metabolismo de la ceramida. El primero radica en que es necesario determinar si los efectos biológicos reportados en este trabajo se deben a la ceramida misma o a otro esfingolípido relacionado. Candidatos interesantes que vale la pena estudiar son las esfingosinas sintéticas que recientemente han aparecido en el mercado. Por otro lado, parece que es necesario extender los estudios sobre la degradación de esfingomielina y el destino metabólico de la ceramida durante el tratamiento con TNF en células sensibles a este factor.

Finalmente, en este estudio se obtuvo evidencia indirecta de la participación de una fosfatasa dependiente de ceramida en el programa de muerte activado por TNF. Dada la importancia de identificar enzimas que participan en la transducción del TNF, cuya función pueda ser regulada por ceramida, el modelo de la línea celular L929 se presenta como un sistema ideal para caracterizar y eventualmente aislar una de estas proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aggarwal, B.B., and Khor, W.H. (1985). **Human tumor necrosis factor,** *Methods in Enzymology: Immunochemical techniques*, Vol. 116 (G. DiSabato, ed), Academic Press, New York, p.448.
2. Aggarwal, B.B., Moffat, B., and Harkins, R.N. (1984). **Human lymphotoxin: Production by lymphoblastoid cell line, purification and initial characterization.** *J. Biol Chem.* 259:686.
3. Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer, S.A., Henzel, W.J., Bringman, T.S., Nedwin, G.E., Goeddel, D.V., and Harkins, R.N. (1985). **Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization.** *J. Biol. Chem.* 260:2345.
4. Garret, I.R., Durie, B.G.M., Nedwin, G.E., Gillespie, A., Bringman, T., Sabatini, M. Bertolini, D.R., and Mundy, G.R. (1987). **Production of lymphotoxin, a bone-resorbing cytokine, by cultured myeloma cells.** *N. Engl. J. Med.* 317:526.
5. Ayrer, R.A., and Aggarwal, B.B. (1988). **Tumor necrosis factor, CRC Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: Effectors of immune system** *(E.R. Podack, ed.), CRC Press, Boca Raton Fla.* p. 105.
6. Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.F., Seeburg. P.H., Palladino, M.A. (1988). **Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.** *Nature* 312:724.
7. Kriegler, M., Pere, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. (1988). **A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembran protein: ramifications for complex physiology of TNF.** *Cell* 53:45.
8. Davis,J.M., Narachi, M.A., Alton, N.K., and Arakawa, T. (1987). **Strcture of tumor necrosis factor α derived from recombinant DNA.** *Biochemistry* 26:1322.
9. Arakawa, T., and Yphantis, D.A. (1987). **Molecular weight of recombinant tumor necrosis factor-α.** *J. Biol. Chem.* 262:7484.
10. Narhi, L.O., and Arakawa, T. (1987). **Dissociation of recombinant tumor necrosis factor α studied by gel permeation chromatography.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:740.
11. Goeddel, D.V., Aggarwal, B.B., Gray, P.W., Leung, D.W., Nedwin, G.E., Palladino, M.A. Patton, J.S., Pennica, D., Shepard, H.M., sugarman, B.J., and Wong, G.H.W. (1986). **Tumor necrosis factor: gene structure and biological activities,** *Cole Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:597.
12. Cuturi, M.C., Murphy, M., Costa-Giomi, M.P., Weimann, R., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1987). **Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes.** *J. Exp.Med.* 165:1581.
13. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.J., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:3666.
14. Pfizenmaier, K., Schuerich, P., schulter, C., and Krönke, M. (1987). **Tumor nrecorsis factor enhances HLA A, B, C, and HLDA DR gene expression in human tumor cells.** *J. Immunol.* 138:975.
15. Rothstein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M.M., Marlin, S.D., Mainoff, E., and Merluzzi, V.R. (1988). **Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines: Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies.** *J. Immunol.* 141:1665.
16. Georg, B., Helseth, E., Lund, L.R., Riccio, A., Dano, K., Unsgaard, G., and Andreasen, P.A. (1989). **Tumor necrosis factor-alpha regulates mRNA for urokinase type plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in human neoplastic cell lines.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 61:87.

17. Trinchieri, G.M., Koyabashi, M., Rosen, M., London,R., Murphy, M., ans Perussia, B. (1986). **Tumor necrosis factor and lymphotixin induce differentiation of human myeloid cell lines in synergy with immune interferon.** *J. Exp. Med.* 164:1206.
18. Balkwill, F.R., (1989). **Cytokines in cancer therapy,** Chap 8, *Oxford University Press,* Oxford.
19. Fillipak, M., Sparks, R.L., Tzen, C., and Scott, R.E. (1988). **Tumor necrosis factor inhibits the terminal event in mesenchymal stem cell differentiation.** *J. Cell. Physiol.* 137:367.
20. Pillaim S., Bilki, D.D., Eessalu, T.E., Aggarwal, B.B., and Elias P.M., (1989). **Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes.** *J. Clin. Invest.* 83:816.
21. Bertolini, D.R., Nedwin, G.e., Bringman, T.S., Smith, D.D., and Mundy, G.R., (1986). **Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors.** *Nature* 319:516.
22. Fráter-Schöeder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Bohlen, P. (1987). **Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro is angiogenic *in vivo.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5277.
23. Beutler, B., and Cerami, A. (1989). **The biology of cachectin /TNF: a primary mediator of host response.** *Annu. Rev. Immunol.* 7:625.
24. Tracey, K.J. and Cerami, A. (1994). **Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapuetic target.** *Annu. Rev. Med.* 45:491.
25. Gruss, H.J., and Dower, S. (1995). **Tumor necrosis factor ligand superfamily involvement in the pathology of malignant lymphomas.** *Cytokines Mol. Ther.* 1:75.
26. Reid T.R., Torti, F.M., and Ringold, G.M. (1989). **Evidence for two mechanism by which tumor necrosis factor kills cells.** *J. Biol. Chem.* 264:4583.
27. Laster, S.N., Wood, J.G., and Goodimg, L.R., (1988). **Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis.** *J. Immunol.* 141:2669.
28. McConkey, D.J., and Orrenius, S. (1994). **Signal transduction pathways to apoptosis.** *Trends Cell. Biol.* 4:370.
29. Fauci, A.S. (1993). **Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: Implication for therapy.** *Science* 262:1011.
30. Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D., (1993). **Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system.** *Science* 262:695.
31. Terai, C., Kornbluth, R.S., Pauza, C.D., Richman, D.D., and Carson, D.A. (1991). **Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblast acutely infected with HIV-1.** *J. Clin. Invest.* 87:1710.
32. Williams, G.T. (1991). **Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis.** *Cell* 65:1097.
33. Korsmayer, S. (1992). **Bcl-2: a repressor of lymphocyte death.** *Immunol Today* 13:285.
34. Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). **Genetic control of programmed cell death in nematode *C. elegans.*** *Cell* 44:817.
35. Ellis, R.E., Yuan, J., and Horvitz, H.R. (1991). **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7:663.
36. Yuan, J., and Horvitz, H.R. (1990). **Genetic mosaic analyses of *ced-3* and *ced-4*, two genes that control programmed cell death in the neamtode *C. elegans.*** *Dev. Biol.* 138:33.
37. Hertgartner, M.O., Ellis, R.E., and Horvitz, H.R. (1992). ***Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death.** *Nature* 356:494.
38. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993). **The *C. elegans* cell death gene ced-4 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme.** *Cell* 75:641.

39. Hertgartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). ***C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*.** *Cell* 76:665.
40. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cassman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). **The t(14:18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining.** *Science* 229:1390.
41. Bakhshi, A., Jensen, J.P., Wright, J.J., McBride, D.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). **Cloning the chromosomal breakpoint of t(14; 18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 an near a transcriptional unit on 18.** *Cell* 41:899.
42. Cleary, M.L., and Sklar, J. (1985). **Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demostration of a breakpoint region near a transcriptionally active locus on chromosome 18.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7439.
43. Hockenbery, D.M., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). **Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.** *Nature* 348:334.
44. Chen-Levy, S., Nourse, J., and Cleary, M.L. (1989). **The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expresssed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(1:4:10) translocation.** *Mol. Cell. Biol.* 9:701.
45. Chen-Levy, S., and Cleary, M.L. (1990). **Membrane topology of Bcl-2 proto-oncogenic protein demostrated *in vitro*.** *J. Biol. Chem.* 265:4929.
46. Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y., and Greaves, M.F. (1992). **Ultastructural localization of Bcl-2 protein.** *J. Histochem. Cytochem.* 40:1819.
47. Allsop, T.E., Wright, S., Paterson H.F., and Davies, A.M. (1993). **The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis.** *Cell* 73:295.
48. Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Mayashita, T., Reed, J.C., Barres, B.A., and Raff M.C. (1993). **Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA.** *Nature* 361:365.
49. Miura, M., Zhu, h., Rotello, R., Hartweig, E.A., and Yuan, J. (1993). **Induction of apoptosis in fibroblast by IL-β-converting enzyme a mammalian homolog of *C. elegans* gen *ced-3*.** *Cell* 75:653.
50. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1994). **Induction of apoptosis by the mouse *nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death and the mammalian IL-1β-converting enzyme.** *Genes Dev.* 8:1613.
51. Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994). **Ich-1 and Ice/Ced3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death.** *Cell* 78:739.
52. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, L.S. (1994). **CPP-32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 and mammalian interleukin-1β-converting enzyme.** *J. Biol. Chem.* 269:30761.
53. Nicholson, D.W., Ali, A., Thomberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.-T., Yu, V.L., and Miller, D.K. (1996). **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.** *Nature* 376:37.
54. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirer, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). **Yamma/CPP-32b, a mammalian homolog of CED-3, is a Crm-A-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP)-ribose polymerase.** *Cell* 81:801.
55. Fau beu, C., Diu, A., Chan, A.W.E., Blanchet, A.-M., Miossec, C., Hervé, F., Collard-Dutilleul, V., S M.S.-S., Levistong, D.J., Hercend, T., and Lalanne, J.-L. (1995). **A novel human**

protease similar to the interleukin-1β-converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J.* 14:1914.

56. Kemens, J., Paskind, M., Hugunin, M., Talanian, R.V., Allen, H., Banach, D., Bump, N., Hackett, M., Johnston, C.G., Li, P. (1995). **Identification and characterization of the interleukin-1β-converting enzyme family of the cysteine proteases.** *J. Biol. Chem.* 270:15250.
57. Munday, N.A., Vaillancourt, J.P., Ali, A., Casano, F.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Yamin, T.T., Yu, V.L., and Nicholson, D.W. (1995). **Molecular cloning and proapoptotic activity of ICE rel-II and ICE rel III, members of the ICE/CED-3 family of the cysteine proteases.** *J. Biol. Chem.* 270:15870.
58. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, L.S. (1995). **Mch-2, a new member of the apoptotic CED-3/ICE cysteine protease gene family.** *Cancer Res.* 55:2737.
59. Duan, H., Chinnaiyan, A.M., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W., and Dixit, V.M. (1996). **ICE-LAP3, a novel mammalian homolog of *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3, is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 271:35013.
60. Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Amstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M., Salveson, G., Earnshaw, W.C., Litwack, G., and Alnemri, L.S. (1995). **Mch-3, a novel human apoptotic cysteine highly related to CPP-32.** *Cancer Res.* 55:6045.
61. Lippke, J.A., Gu, Y., Sarnecki, C., Caron, P.R., and Su, M.S.-S. (1996). **Identification and characterization of CPP-32/Mch-2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP-32.** *J. Biol. Chem.* 271:1825.
62. Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G., Froelich, C.J., He, W.-W., and Dixit, V.M. (1996). **ICE-LAP6, a novel member of the ICE/ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B.** *J. Biol. Chem 271:16720.*
63. Miura, M., Friedlander, R.M., and Yuan, J. (1995). **Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a crmA-sensitive cell death pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8318.
64. Kumar, S., and Baglioni, C. (1991). **Protection from tumor necrosis factor mediated cytolysis by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2.** *J. Biol. Chem.* 266:20960.
65. Kuaffmann, S., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davison, N., and Poirer, G. (1993). **Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.** *Cancer Res.* 53:3976.
66. Schreiberm V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., DeMurcia, G., and DeMurcia, J.M. (1995). **A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4753.
67. Mallet, S., Barclay, A.N. (1991). **A new superfamily of cell suface proteins related to nerve growth factor.** *Immunol. Today* 12:220.
68. Itoh, N., Yonehera, S., Ishii, A., Yonohera, M., Mizushima, S.-I., Samecçshima, M., Hase, A., Seto,Y., Nagata, S. (1991). **The polypeptide encoded by cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate Apoptosis.** *Cell* 66:233.
69. Klein, R., Jing, S., Nandur, V., O'Rourke, E., Barbacid, M. (1991). **The trk proto-oncogen encodes a receptor for nerve growth factor.** *Cell* 65:189.
70. Stamenkovic, I., Clark, E.A., Seed, B. (1989). **A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas.** *EMBO J.* 8:1403.
71. Mallet, S., Fossum, S., Barclay, A.N. (1990). **Characterization of MRCOX40 antigen of activated CD4 positve T lymphocytes-a molecule related to nerve growth factor receptor.** *EMBO J.* 9:1063.
72. Beutler, B., Milsark, I.W., and Cerami, A. (1985). **Cachentin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate *in vivo*.** *J. Immunol.* 135:3972

73. Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E., and Hass, P.E. (1985). **Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ-interferon.** *Nature* 318:665.
74. Kull, F.C., Jacobs, S., and Cuatrecasas, P. (1985). **Cellular receptor for 125I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling and relationship to sensitivity.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 82:5756.
75. Ding, A.H., Sanchez, S., and Nathan, C.F. (1989). **Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide.** *J. Biol. Chem.* 264:3924.
76. Engelmann, H., Holtmann, H., Brakesbush, C., Avni, Y.S., Sarv, I., Nophar, Y., Hadas, E., Leitner, O., and Wallach, D. (1990) **Antobodies to a soluble form of tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity.** *J. Biol. Chem.* 265:14497.
77. Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., Reynolds, C., Palladino, M.A., and Goeddel, D.V. (1991). **Two differents receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:9292.
78. Wong, G.H.W., Tartaglia, L.A., Lee, M.S., and Goeddel, D.V. (1992). **Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type 1 TNF receptor.** *J. Immunol.* 149:3550.
79. Wiegmann, K., Schütze, S., Kampen, E., Himmler, A., Machleitdt, T., and Krönke, M. (1992). **Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades.** *J. Biol. Chem.* 267:17997.
80. Tartaglia, L.A., and Goeddel, D.V. (1992). **Tumor necrosis factor receptor signaling: a dominant negative mutation supresses the activity of the 55-kDa tumor nercrosis factor receptor.** *J. Biol.Chem.* 267:4304.
81. Wiegmann, K., Schutze,S., Kampen, E., Himmier, A., Machleidt, T., and Krönke, M. (1992). **Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades.** *J. Biol Chem.* 267:17997.
82. Brakebush, C., Nophar, Y., Kemper, O., Engelmann, H., and Wallach, D. (1992). **Cytoplasmic truncation of p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor abolish signalling, but not induced shedding of receptor.** *EMBO J.* 11:943.
83. Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., Goeddel, D.V. (1993). **A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.** *Cell* 74:845.
84. Dieter, A., Wiegmann, K., Adam-Klieges, S., Ruff, A., and Krönke, M. (1996). **A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor iniciates the neutral sphingomyelinase pathway.** *J. Biol. Chem.* 271:14617.
85. Hunter, T. (1987). **A thousand and one protein kinases.** *Cell* 50:823.
86. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). **The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation.** *Cell* 81:495.
87. Hsu, H., Shu, H.-B., Pan, M.-G. and Goeddel, D.V. (1996). **TRADD-TRAF2 ansd TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.** *Cell* 84:495.
88. Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996). **FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO1)- and TNF-receptor induced apoptosis.** *J.Biol.Chem.* 271:4961.
89. Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.-H., Kim, E., and Seed, B. (1995). **RIP: a novel protein containing a death domain that intaracts with Fas/APO1 (CD95) in yeast and causes cell death.** *Cell* 81:513.

90. Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V. (1994). **A novel family of putative signal transducers associated with cytoplasmic domain of 75 kDa tumor necrosis factor receptor.** *Cell* 78:681.
91. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M., and Goeddel, D.V. (1995). **TRAF2-mediated activation of NF-kB by TNF receptor 2 and CD40.** *Science* 269:1424.
92. Hu, M.H., O'Rourke, K., Boguski, M.S., and Dixit, V.M. (1994). **A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40.** *J. Biol. Chem.* 269:30069.
93. Cheng, G., Clearly, A.M., Ye, Z., Hong, D.I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995). **Involvement of CRAF2, a relative of TRAF, in CD40 signaling.** *Science* 267:1494.
94. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). **The Epstein-Barr virus transforming protein LMP engages signaling proteins for the tumor necrosis facotr receptor family.** *Cell* 80:389.
95. Sato, T., Irie, S., and Reed, R.C. (1995). **A novel member of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40.** *FEBS Lett.* 358:113.
96. Adam-Klieges, S., Dieter, A., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., and Krönke, M. (1996). **FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase.** *Cell* 86:937.
97. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhan, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996). **FLICE, a novel FADD homologous ICE/CED3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.** *Cell* 85:817.
98. Pfizenmaier, K., Himmler, A., Schütze, S., Scheurich, P., and Krönke, M. (1992). In Beutler, B. (ed), **Tumor Necrosis Factor: The molecules and their emerging role in medicine.** *Raven Press, New York, NY.* pp 439.
99. Schütze, S. Notrott, K., Pfizenmaier, K., and Krönke, M. (1990). **Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C.** *J. Immunol.* 144:2604.
100. Ways, D.K., Cook, P.P., Webster, C., and Parker, P.J. (1992). **Effect of phorbol esters on portein kinase C-ζ.** *J.Biol. Chem.* 267:4799.
101. Irvine, L. (1982). **Effects of tumor promoters on arachidonic acid metobolism by cells in culture,** (E. Heckner, N.E., Fusening, W. Kunz, F. Marks, and H.W. Thielmann, eds.), vol. 7, *Carcinogenesis, Raven Press, New York,* pp. 477.
102. Ford-Hutchinson, A.W. (1985). **Leukotreins: their formation and role as inflammatory mediators,** *Fed. Proc.* 44:25.
103. Roberts, M.F. (1994). **First thoughts on lipid second messengers.** *Trends in Cell Biol.* 4:219.
104. Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K. (1995). **PKCζ is a molecular switch in signal transduction of TNF, bifunctionally regulated bye ceramide and arachidonic acid.** *EMBO J.* 14:1961.
105. Nakashima, S., Nagata, K., Ueeda, K., and Nozawa, Y. (1988). **Stimulation of arachidonic acid release by guanine nucleotide in saponin-permeabilized neutrophils: evidence for involment of GTP-binding protein in phospholipase A2 acivation.** *Arch. Biochem. Biophis.* 261:375.
106. Silk, S T., Clejan, S., and Witkom, K. (1989). **Evidence of GTP-biding protein regulation of phospholipase A2 activity in isolate human platelet membranes.** *J. Biol.Chem.* 264:21466.
107. Imura, K., Sherman, M.L., Spriggs, D., and Kufe, D. (1988). **Effect of tumor necrosis factor on GTP binding ans GTPase activity in HL-60 and L929 cells.** *J. Biol. Chem.* 263:10247.

108. Branellec, D.E., Cremoux, P., Barreau, P., Calvo, F., and Chouaib, S. (1992). **Tumor necrosis factor-mediated cell lysis in vitro: relationship to cAMP accumulation and guanine nucleotide-binding proteins.** *Eur. J. Immunol.* 22:963.

109. Beyaert, R., and Fiers, W. (1994). **Molecular mechanism of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not.** *FEBS Lett.* 340:9.

110. Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., Krönke, M. (1994). **Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling.** *Cell* 78:1005.

111. Heller, R.A., Krönke, M. (1994). **Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways.** *J. Cell Biol.* 126:5.

112. Machleidt, T., Wiegmann, K., Henkel, T., Schütze, S., Baeuerle, P., and Krönke, M. (1994). **Sphingomyelinase activates proteolytic I-κB-α degradation in a cell-free system.** *J. Biol. Chem.* 269:13760.

113. Kim, M.Y., Linardic, C., Obeid, L., and Hannun, Y.A. (1991). **Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor-α and γ-interferon.** *J. Biol. Chem.* 266:484.

114. Liu, N.G., Mathias, S., Yang, Z., and Kolesnick, R.N. (1994). **Renaturation and tumor necrosis-alpha stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase.** *J. Biol Chem.* 269:3047.

115. Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, A., Basu, S., and Kolesnick, R. N. (1995). **Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase.** *Nature.* 378:307.

116. Kolesnick, R.N. (1991). **Sphingomyelin and derivatives as cellular signals.** *Prog. Lip Res.*30:1.

117. Kennelly, PJ., and Krebs, E.G. (1991). **Consensus sequences as subatrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases.** *J. Biol. Chem.* 266:1555.

118. Joseph, C.K., Byun, H.-S., Bittman, R., and Kolesnick, R.N. (1993). **Substrate recognition by ceramide.activated protein kinase: Evidence that kinase activity is proline-directed.** *J. Biol. Chem.* 268:20002.

119. Dobrowsky, R.T., and Hannun, Y.A. (1992). **Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase.** *J. Biol Chem.* 267:5048.

120. Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C., and Hannun, Y.A. (1993). **Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A.** *J. Biol.Chem.* 268:15523.

121. Cohen, P. (1989). **Structure and regulation of protein phosphatases.** *Annu. Rev. Biochem.* 58:453.

122. Law, B., and Rossie, S. (1995). **The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulate by C2-ceramide.** *J. Biol. Chem.*270:12808.

123. Bialojan, C., and Takai, A. (1988). **Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases.** *Biochem.* J. 256:283.

124. Cohen, P., and Cohen, P.T.W. (1989). **Protein phosphatases come of age.** *J. Biol. Chem.* 264:21435.

125. Okazaki, T., Bell, R.M., and Hannun, Y.A. (1989). **Sphingomyelin turnover indeced by vitimin D_3 in HL-60.** *J. Biol. Chem.* 264:19076.

126. Mathias, S., Dressler, K.A., and Kolesnick, R.N. (1991). **Characterization of a ceramide-activated protein kinase: Stimulation by tumor necrosis factor α.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10009.

127. Goldkorn, T., Dre[illegible]er, K.A., Muindi, J., Radin, N.S., Medelsohn, J., Menaldino, D., Liotta, D., and Kolesnick, R.N. **Ceramide stimulates epidermal growth fact[illegible]r receptor phosphorylation in A431 human epidermoid carcinoma cells.** *J. Biol. Chem.* 266:16092.

128. Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R.M., and Hannun, Y.A. (1990). **Role of ceramide as a lipid mediator of 1α, 25- dihydroxivitamin D3 induced HL-60 cell differentiation.** *J. Biol. Chem.* 265:15823.

129. Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. (1993). **Programmed cell death induced by ceramide.** *Science* 259:1769.

130. Boucher, L.-M., Wiegmann, K., Futterer, A., Pfeffer, K., Machleidt, T., Schütze, S., Mak, T.W., and Krönke, M. (1995). **CD28 signals through acidic sphingomyelinase.** *J. Exp. Med.* 181:2059.

131. Gulbins, E., Bissonette, R., Mahboundi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier,-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F., et al. (1995). **Fas-induced apoptosis is mediated via ceramide-iniciated ras signalling pathway.** *Immunity* 2:341.

132. Merril, A.H., Jr. and Jones, D.D. (1990). **An uptake of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1044:1.

133. Rother, J., Van Echten, G., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K., (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:14.

134. Van Echten, G., and Sandhoff, K. (1993). **Ganglioside metabolism. Enzimology, topology, and regulation.** *J. Biol. Chem.* 268:5341.

135. Kolesnick, R.N., and Hermer, M.R. (1990). **Characterization of a ceramide kinase from human leukemia (HL-60) cells. Separation from diacylglycerol kinase activity.** *J. Biol.Chem.* 265:18803.

136. Dressler, K.A., and Kolesnick, R.N. (1990). **Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin.** *J. Biol. Chem.* 265:14917.

137. Holleran, W.M., Feingold, K.R., Mao-Quiang, M., Gao, W.N., Lee, J.M., and Elias, P.M. (1991). **Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function.** *J. Lipid. Res.* 32:1151.

138. Hampton, R.Y., and Morad, O.H. (1989). **Sphingomyeline synthase and PKC activation.** *Science* 246:1050.

139. Spence, M.W. (1993). **Sphingomyelinases.** *Adv. Lipid Res.* 26:3.

140. Chatterjee, S. (1993). **Neutral sphingomyelinase.** *Adv. Lipid Res.* 26:25.

141. Wertz, P.W., and Dowing, D.T., (1990). **Ceramidase activity in porcine epidermis.** *FEBS Lett.* 268:110.

142. Buehrer, b.M., and Bell, R.M. (1992). **Inhibition of sphingosine kinase and platelets. Implications for signal transduction pathways.** *J.Biol.Chem.* 267:3154.

143. Van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P. (1993). Adv. Lipid Res. 26:69.

144. McCachren, S.S., Salehi, Z., Weinberg, J.B., and Niedel, J.E. (1988). **Immunochemical similarity of the human plasma growth hormone-binding protein and the rabbit liver growth hormone receptor.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151:574.

145. Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Jr., Browning, J.L., Gewirtz, D.A., Kolesnick, R.N., and Grant, S. (1994). **Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells.** *J. Biol. Chem.* 269:31685.

146. Ohta, H., Yatomi, Y., Sweeney, E.A., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1994). **A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-α in neutrophils.** *FEBS Lett* 355:267.

147. Ballou, L.R., Barker, S.C., Postlethwaite, A.e., and Kang, A.H. (1990). **Sphigosine potentiates IL-1 mediated prostaglandin E2 production in human fibroblast.** *J.Immunol.* 145:4245.

148. Ballou, L.R., Chao, C.P., Honless, M.A., Barker, S.C., and Raghow, R. (1992). **Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphongomyelin metabolism. Evidence of regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide.** *J. Biol. Chem.* 267:20044.

149. Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). **The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*.** *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287.

150. Fanidi, A., Harrington, E.A., and Evan, G.I. (1992). **Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncognes.** *Nature 359:554.*

151. Vassualt, A. (1983). **Lactate deshydrogenase.** *In Methods of Enzimatic Analysis.* (Bergmayer, H.U., and Bergmayer, J. Eds.). Vol. 3 pp. 118, Verlag Chemic, Weinheim, GFR.

152. Blight, M.M., and Dyer, W.J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911.

153. Ostle, B. (1983). **Estadística aplicada.** *Limusa, México.* p:629.

154. Gómez, E.O., Mendoza-Milla, C., Ibarra-Sánchez, M.J., Ventura-Gallegos, J.L., and Zentella, A. (1996). **Ceramide reproduces late appearence of oxidative stress during TNF-mediated cell death.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228:505.

155. Hayakawa, M., Jayadev, S., Tsujimoto, M., Hannun, Y.A., and Ito, F. (1996). **Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxigenase 2.** *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 220:681.

156. Kaur, P., Welch, W.J., and Saklatvala, J. (1989). **Interleukin 1 and tumor necrosis factor increase phosphorylation of small heat shock protein. Effects in fibroblast, Hep G2 and U937.** *FEBS lett.* 258:269.

157. Vietor, I., Schwenger, P., Schessinger, J., and Vilcek, J. (1993). **Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblast.** *J. Biol. Chem.* 268:18994.

158. Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Taylor, R.S., Gerwitz, D.A., and Grant, S. **Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:73.

159. Bielawska, A., (1993). **Selectivity of ceramide-mediated biology.** *J. Biol.Chem.* 268:26226.

160. Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C., and Hannun, Y.A. **Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A.** *J. Biol. Chem.* 268:15523.

161. Dressler, K.A., Mathias, S., and Kolesnick, R.N. (1992). **Tumor necrois factor-a activates the sphingomyelin pathway in a cell free system.** *Science* 255:1715.

162. Raines, M.A., Kolesnick, R.N., and Golde, D.W. (1993). **Sphigomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells.** *J. Biol. Chem.* 268:14572.

163. Hennet, T., Bertoni, G., Richter, C., and Peterhans, E. (1993). **Expression of Bcl-2 protein enhances the survival of mouse fibrosarcoid cells in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity.** *Cancer Res.* 53:1456.

164. Gómez, E., Zentella, A. (1996). **Bcl-2 expression in murine L929 fibroblasts protects against TNFα-mediated cytotoxicity : interference with receptor activated programmed cell death.** *Bol. Estud. Med. Biol., Mex.* 44:91.

165. Kolesnick, R., and Golde, D.W. (1994). **The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling.** *Cell* 77:325.

166. Jayadec, S., Liu, B., Bielawska, A., Lee, J.Y., Nazaire, F., Pushkareva, M., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1995). **Role for ceramide in cell cycle arrest.** *J. Biol. Chem.* 270:2047.

167. Haimovitz-Friedman, A., Ehleiter, D., Persuad, R.S., McLoughlin, M., and Fuks, A., and Kolesnick, R. N. (1994). **Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide an iniciate apoptosis.** *J. Exp. Med.* 180:525.

168. Mordur, V., Zimmeerman, A.G., Prescott, M.S., and McIntyre, T.M. (1996). **Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor α.** *J. Biol. Chem.* 271:13094.

169. Belka,C., Wiegmann, K., Holland, R.M., Neulogh, M., Herrmann, F., Krönke, M., and Brach, M.A. (1995). **Tumor necrosis factor (TNF)-α activates c-raf-1 kinase via p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelase.** *EMBO J.* 14:1156.

170. Hannun, Y.A. (1994). **The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide.** *J. Biol. Chem.* 269:3125.

171. Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1994). **Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction.** *J. Biol. Chem.* 269:19605.

172. Testi, R. (1996). **Sphingomyelin breakdown and cell fate.** *Trends Biochem. Sci.*21:468.

173. Liu, Z., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). **Dissection if TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death.** *Cell* 87:565.

174. Ballou, L.R., Laulederkind, S., Rosloneic, E.F., Raghow, R. (1996). **Ceramide signalling and immune response.** *Biochim. Biophys. Acta* 1301:273.

175. Van Veldhoven, P.P., Bishop, W.R., and Bell, R.M. (1989). **Enzymatic quantification of sphingosine in the picomole range in cultured cells.** *Anal. Biochem.* 183:177.

APENDICE 1

Preparación del medio de cultivo esencial mínimo (MEM).

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen del medio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4g/l de MEM en polvo (GIBCO-BRL). agitándose suavemente, se agregan 2.2g/l de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina, a ajusta el pH a 7.2, empleando para ello ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.22 micras.

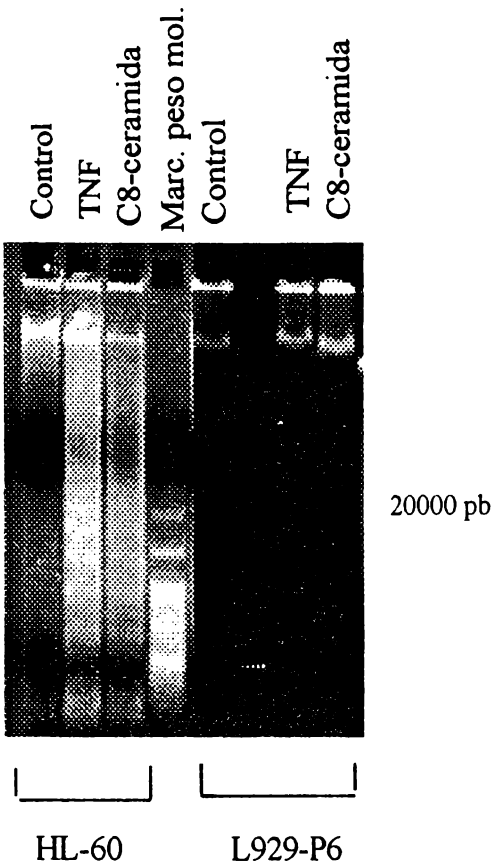
Composición del MEM

Aminoácidos	Concentración (mg/l)
L-alanina	8.90
L-arginina-HCl	126.00
L-asparagina-H_2O	13.20
L-ácido aspártico	13.30
L-cistina-2HCl	31.00
L-ácido glutámico	14.70
L-glutamina	292.00
Glicina	7.50
L-histidina-HCl-H_20	42.00
L-isoleucina	52.00
L-leucina	52.00
L-lisina-HCl	72.50
L-metionina	15.00
L-fenilalanina	32.00
L-prolina	11.50
L-serina	10.50
L-treonina	48.00
L-triptofano	10.00
L-tirosina (sal disódica)	52.00
L-valina	46.00
Sales inorgánicas	
$CaCl_2$	200.00
KCl	400.00
$MgSO_4$	96.67
NaCl	6800.00
NaH_2PO_4	140.00
Vitaminas	
D-Ca pantetonato	1.00
Cloruro de colina	1.00
Acido fólico	1.00
Inositol	2.00
Nicotinamida	1.00
Piridoxal	1.00
Tiamina-HCl	1.00
Rivoflavina	0.10

Otros componentes	
Rojo fenol	10.00
D-glucosa	1000.00

APENDICE 2

A. Efecto de TNF y C8-ceramida sobre la fragmentación del DNA en células HL-60 y L929-P6.



Las células HL-60 fueron sembradas a una densidad de 50 000 células/ml e incubadas con TNF (1μg/ml) por 6 hrs. Las células L929-P6 se sembraron a una densidad de 20 000 cel/cm^2 e incubadas con TNF por 24 hrs. La células fueron lisadas en un solución de Nonidato-P40, posteriormente los lisados fueron tratados con 500μg/ml de proteinasa K a 55 °C por 15 hr y se centrifugaron a 30 000 x g por 75 min a 4 °C. El pellet fue descartado y el sobrenadante fue tratado con ribonucleasa A (100μg/ml) a 37 °C por 18 hrs. Los fragmentos de DNA en los extractos finales fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa al 2.5% impregnado con bromuro de etidio y fue visualizado bajo luz ultravioleta.

B. Efecto de TNF y C6-ceramida sobre la reducción de MTT por número de célula viable en células sensibles y resistentes al TNF.

Tratamiento	Clona de L929	Viabilidad (% con respecto al control)	Periodo de tratamiento	Reducción de MTT/célula viable (Incremento)
TNF	P6	97	12	1.1
		37	24	2.9
		13	36	7.7
	D.3 (Bcl-2)	45	36	1.7
	CR1	16	36	5.5
	EE29	58	36	1.6
C8-ceramida	P6	11	15	9.1
	D.3	44	15	2.5
C6-ceramida	CR1	24	18	3.0
	EE29	23	18	3.3

1. Datos tomados de la referencia 154. Gómez, E.O., Mendoza-Milla, C., Ibarra-Sánchez, M.J., Ventura-Gallegos, J.L., and Zentella, A. (1996). **Ceramide reproduces late appearence of oxidative stress during TNF-mediated cell death.** *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 228:505.