

03081

**CORRELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
INDUCIDO POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
ALFA (TNF α) Y SUS EFECTOS CITOSTÁTICO Y
CITOTÓXICO EN CÉLULAS L929.**

TESIS QUE PRESENTA

M EN IBB ERIKA OLIVIA GÓMEZ GONZÁLEZ

Para optar por el grado de
Doctora en Investigación Biomédica Básica

Tutor

Dr. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

"LA IDEA, POR SU NATURALEZA MISMA, NECESITA SER
COMUNICADA: ESCRITA, EXPLICADA, REALIZADA. COMO LA
HIERBA, LA IDEA BUSCA LA LUZ, AMA LAS MULTITUDES,
LAS CRUZAS LA ENRIQUECEN, CRECE MÁS VIGOROSA
CUANDO SE LA PISA."

Úrsula K. Le Guin en Los Desposeídos

Esta tesis está dedicada a una persona
sin la cual hubiera sido imposible
su realización y finalización,

al Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Gracias a mi mamá, porque me educó como persona y no como mujer.

Gracias a mi hermano por su respeto de siempre a mi persona.

Gracias a mis maestr@s del IMI porque jamás consideraron otra opción que enseñarme a ser responsable de mi misma, independiente y con opiniones propias respecto a todo.

Gracias a la FLAG, a Mónica y Julie, sin ustedes simplemente no lo hubiera logrado.

Gracias a mi hermana Claudia y a mi sobrina Carina por su cariño, por quererme porque sí.

Gracias a mi tía Chela, a la abuela Tina, a Silvana, a Jessy, a Axel, a Moi, a Luis, a Gilda, a Diana, a Nelly y a Iván por aceptarme en nuestra familia.

Gracias a mis amigas de toda la vida Isa, Vero, y Elsa-po por todo el tiempo que me han aguantado y lo que falta...

Gracias a Pati por preocuparse siempre por mi felicidad y por aconsejarme con toda razón que no me case con un mexicano.

Gracias a Jutta por todo lo compartido, por ser una mujer fuerte capaz de mirar las cosas como son y hacer que el camino no se vea solitario.

Gracias a María por el ejemplo de su valentía sin aspavientos, ojalá cuando sea grande sea como ella.

Gracias a Winny y Nannys, por su apoyo en las buenas y en las malas. Los extraño.

Gracias a Fernando, un amigo incondicional con el que cuento siempre. Tienes todo mi cariño.

Gracias a Jorge por sus visitas de doctor que me alegran tanto y su amistad por correspondencia.

Gracias a Marisol porque desde que empezamos a cerrar círculos en París, no he parado.

Gracias a Domingo por estar siempre al lado de quien lo necesita.

Gracias a tod@s mis alumn@s, aprendí más de ustedes que en todas las clases que he tomado en mi vida.

Gracias a Francisco, mi querido amigo, por recordarme que escuchar al corazón es la mejor manera de vivir.

Gracias a Cris y a Cati, amigas a toda prueba, capaces de querer con todo el corazón y de demostrarlo. Espero que sepan cuánto agradezco su cariño.

Gracias a Adriana por estar siempre dispuesta a echar una platicadita y por compartir mis otros intereses no muy científicos.

Gracias a Salvador, la mejor persona del laboratorio, por su paciencia, su tolerancia, su apoyo especialmente en momentos difíciles.

Gracias a Fernando (el pollo) porque charlar con él siempre es un placer y conocer a alguien auténtico un verdadero honor.

Gracias a Melchor por ser tan simpático y por los inolvidables viajes a Las Manzanas.

Gracias a Joselín por su carácter alegre y fuerte a la vez. Quizá el machismo si sea una característica nacional.

Gracias a Omar por ser tan natural en su rebeldía y hacer lo que realmente quiere a cada momento.

Gracias a Emilio porque a pesar del poco tiempo sabes que cuentas con él, y porque aunque es buena gente y divertido no se la cree.

Gracias a Josué por dar un toque de ecuanimidad a este laboratorio y aportarme tanto como persona y como estudiante.

Gracias a Delina porque trabajar con ella es muy agradable y su vena sarcástica es fabulosa.

Gracias a Nohemí por las charlas, te extraño nieta.

Gracias a Lucia porque es capaz de aceptar a todas las personas, por extrañas que parezcamos y por todo lo que nos hemos divertido juntas.

Gracias a mis hijas Pilar y Eréndira, fue divertido ser su madre.

Gracias a Ruy por ser tan buena persona y transmitir su paz en este nido de locos.

Gracias a José Luis por todo su apoyo en el trabajo y últimamente también por su apoyo personal, de verdad te lo agradezco.

Gracias a Mina, Albino, Rebe, Mari y Rafael, no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Gracias a todas las otras personas con las que he compartido el trabajo en el laboratorio del Dr. Zentella y en el IFC.

Gracias a Pati Casas y a Rocío Alcántara, tan cercanas como cualquier persona del laboratorio y a veces más. Compartir con ustedes estos años me ha dado más de lo que imaginan, hablar con ustedes es crecer.

Gracias a Fernando Arroyo por estar siempre dispuesto a bromear.

Gracias a Rocío Camarillo por todo, la lista es muuuy larga...

Gracias, por último, a Alejandro, no pude haber tenido mejor tutor. Todavía no sé cómo me aguantaste.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
1. Antecedentes históricos	9
a) Necrosis tumoral	9
b) Caquexia	10
2. Situación actual	11
a) TNF α y enfermedad	11
b) Obesidad	13
c) Organogénesis linfoide	14
d) Neuromodulación	15
3. Descripción molecular	15
a) Localización y estructura del gen	15
b) Producción	17
c) Estructura de la proteína	19
4. Receptores	21
5. Efectos celulares	24
a) Activación	24
b) Efectos asociados a la caquexia y la diabetes	26
c) Efectos antitumorales	27
6. Señalización de la muerte celular	28
a) Sucesos próximos al receptor	29
b) Cambios en la expresión génica	31
c) Vías específicas de la muerte apoptótica	34
d) Señalización de la muerte no específicamente apoptótica	39
ANTECEDENTES	47
OBJETIVO	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN	95
PERSPECTIVAS	96
DISCUSIÓN GENERAL.....	97
BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXO	

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guerin
LPS	Lipopolisacárido
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
LT α	Linfotoxina alfa
LT β	Linfotoxina beta
IL-1	Interleucina 1
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
TACE	Enzima convertasa del TNF α
Erk	Cinasa regulada por señales extracelulares
TNFR-I	Receptor del TNF α tipo I
TNFR-II	Receptor del TNF α tipo II
DD	Dominio de muerte
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SODD	Silenciador de dominios de muerte
TRADD	Proteína asociada al dominio de muerte del R-I
RIP1	Proteína 1 de interacción con el receptor
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte de Fas
TRAF	Factor asociado al receptor del TNF α
I κ B	Inhibidor de NF- κ B
IKK	Complejo de cinasas inhibidoras de I κ B
NIK	Cinasa inductora de NF- κ B
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógeno
PI(3)K	Cinasa de 3-fosfatidil inositol
DED	Dominio efector de la muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de la muerte
PARP-1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PKC	Proteína cinasa C
Smasa	Esfingomielinasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
MEM	Medio esencial mínimo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
DTT	Ditiotreitol
DTE	Ditioeritritol
DMSO	Dimetilsulfóxido
2-ME	2-mercaptoetanol
DCFH	Diclorofluorescina
DCF	2',7'-diclorofluoresceína

RESUMEN

Introducción. El factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) induce la muerte celular de distintas células transformadas. Este proceso, que median sus receptores TNFR-I y TNFR-II, puede llevarse a cabo con características apoptóticas o necróticas. En los fibroblastos transformados de ratón L929, la muerte necrótica que causa el $\text{TNF}\alpha$ se asocia a daño mitocondrial y estrés oxidativo. **Planteamiento del problema.** A pesar de la gran cantidad de literatura que confirma lo anterior, no existen estudios en los que quede claro si el estrés oxidativo es parte fundamental del proceso citotóxico o únicamente la consecuencia final del daño celular generalizado. **Objetivo.** Determinar el papel que el estrés oxidativo juega en la citotoxicidad que causa el $\text{TNF}\alpha$ sobre las células L929. **Hipótesis.** Esperamos que la temporalidad de la presencia de las especies reactivas, así como su comportamiento en clones resistentes a la citocina nos indique qué tan cruciales son para que la muerte ocurra. **Materiales y métodos.** Para cubrir los objetivos, se trataron las células L929 con la citocina y se identificaron las especies reactivas de oxígeno con sondas moleculares como el MTT y el DCF y su correlación con la muerte celular. **Resultados.** Encontramos un estrés oxidativo tardío detectable por el MTT (presumiblemente causado por superóxidos) y otro temprano que se detectó por DCF. El análisis de los datos de la detección del MTT en distintas condiciones indican una correlación la muerte de las células en cultivo y un valor que llamamos índice de estrés oxidativo (MTT reducido/no. celular, experimento/control). El estrés oxidativo que se detecta por el DCF no muestra correlación con la muerte inducida por el $\text{TNF}\alpha$ ya que se presenta indistintamente en las células resistentes y en las sensibles. Por último, se encontró que la citocina tiene un efecto sobre el ciclo celular que se manifiesta como citostasis en las células que se encuentran en G_0/G_1 y también con la acumulación de las células en la fase S en las células que ciclan de forma asincrónica. **Conclusión.** Determinamos un valor que denominamos índice de estrés oxidativo y concluimos que en el modelo de muerte que induce el $\text{TNF}\alpha$ sobre las células L929 existe un umbral en el que a partir de un índice de estrés oxidativo igual a 2 se inicia la muerte.

INTRODUCCIÓN

El factor de necrosis tumoral

1. *Antecedentes históricos*

a) Necrosis tumoral

Desde finales del siglo XVIII, los médicos notaban ocasionalmente que los enfermos de cáncer experimentaban una mejoría cuando padecían una infección bacteriana severa, incluso en algunos casos, el tumor desaparecía. Un siglo después, el médico neoyorquino William B. Coley pasó de las observaciones a la experimentación y utilizó preparaciones que derivó de bacterias gram-positivas y negativas en el tratamiento de cáncer. Este cirujano fue el primero en describir la necrosis tumoral que se induce por toxinas bacterianas (Coley, W. B., 1893; Fiers, W., 1991).

En 1975, Lloyd Old y sus colaboradores (Carswell, E. A. *et al.*, 1975) retomaron estas observaciones y demostraron que el tratamiento de ratones o conejos con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), al que sigue una inyección de lipopolisacárido (LPS), producía la liberación a la circulación de una proteína que llamaron factor de necrosis tumoral (TNF). La principal aportación del grupo de Old fue demostrar que la actividad necrozante de tumores era un factor que se derivaba del hospedero y no del bacilo, y proponer que la fuente principal del factor eran los macrófagos. Ellos observaron también que el TNF tenía un efecto tóxico sobre las células tumorales en cultivo y que en ratones con sarcoma que se induce con metilcolantreno provocaba una rápida necrosis hemorrágica y regresión tumoral.

b) Caquexia

Otro capítulo de la historia del TNF se escribió a partir de estudios completamente independientes que condujeron Cerami y sus colaboradores desde principios de los 80' s. Este grupo tenía interés en identificar el agente o agentes causales de la pérdida de masa corporal característica de pacientes con infecciones crónicas o con cáncer, condición que se conoce como emaciación o caquexia (Beisel, W. R., 1975). Ellos demostraron que una condición muy similar a la caquexia se reproducía en ratones que se trataban con endotoxina bacteriana; además, el suero de estos animales podía causar caquexia si se transfería a un ratón singénico sano, lo que sugería que la endotoxina inducía la liberación de factores endógenos que promueven este desbalance fisiológico. En 1985 aislaron un factor, que producen los macrófagos e inducible por endotoxina, capaz de suprimir la actividad de la lipoproteína lipasa en la línea de adipocitos 3T3/L1 (Beutler, B. *et al.*, 1985a). El factor se llamó caquectina por su presunto papel en el origen de la caquexia, pero para sorpresa de todos la secuencia del amino terminal fue altamente homóloga a la secuencia del TNF humano que se determinó pocos meses antes. La caquectina y el TNF α , como se nombra hoy a esta molécula, representan entonces "dos caras de la misma moneda" (Beutler, B. *et al.*, 1985b).

La clonación del gen y la purificación de la proteína recombinante se tradujeron en una verdadera explosión informativa. Se hizo claro que el TNF α , que originalmente se definió por su actividad antitumoral, ejercía también distintos efectos sobre las células normales y era mediador de inflamación y respuestas inmunes celulares. En estudios experimentales con animales, el grupo de Cerami encontró que una dosis baja del TNF α recombinante (0.2-0.6

mg/kg de peso corporal) inducía taquipnea e hipotensión moderadas, mientras que dosis más altas (0.6-3.6 mg/kg de peso corporal) inducían taquicardia, taquipnea, hipotensión y acidosis metabólica seguidas de necrosis hemorrágicas en intestino, pulmón y otros órganos, lo que llevaba a la muerte (Tracey, K. J. *et al.*, 1986). Las alteraciones que evoca el TNF α en ratones, ratas y primates recuerdan al choque séptico o daño orgánico múltiple característico de pacientes con septicemia aguda. Esta es la razón por la que, aunque esta molécula en combinación con el interferón puede suprimir tumores en modelos animales (Gruss, H. J. y Dower, S. K., 1995), el valor terapéutico del TNF α en el tratamiento contra el cáncer es limitado.

2. Situación actual

a) TNF α y enfermedad

El TNF α pertenece a una clase de moléculas -similares a hormonas- llamadas citocinas, que incluye los interferones, interleucinas y los factores de crecimiento hematopoyético. Estos mediadores polipeptídicos forman una red compleja de señales que regulan su propia producción, y la proliferación, diferenciación o función de casi todas las células de los sistemas reticuloendotelial, hematopoyético e inmune. Las funciones específicas del TNF α son variadas e incluso contradictorias sobre diferentes tipos celulares. En este sentido, además de su papel como mediador central del choque séptico (Beutler, B. *et al.*, 1985c; Tracey, K. J. *et al.*, 1987), esta citocina induce actividad antiviral (Wong, G. H. *et al.*, 1988) y muchos tipos celulares infectados con virus se tornan sensibles a los efectos del TNF α (Czarniecki, C. W., 1993). Por otro lado, también participa en la regulación inmune y la

resistencia a varios protozoarios (Wong, G. H. y Goeddel, D. V., 1986; Malik, S. y Balkwill, F. R., 1988). Hallazgos recientes indican que las vías de transducción del TNF α que median sus receptores proveen protección al hospedero durante infecciones parasíticas por protozoarios como *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* spp. (Derouich-G., D. et al., 2001).

Asimismo niveles altos de este factor en suero se implican en la patogénesis de la malaria cerebral (Grau, G. E. et al., 1989) y en la destrucción tisular por inflamación (Beutler, B. y Cerami, A. C., 1988).

El TNF α usualmente se produce en exceso en las enfermedades inflamatorias/autoinmunes crónicas como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. Cuando se induce su sobreproducción en modelos animales, se reproducen patologías similares, lo que apoya la idea de que esta citocina juega un papel importante en su desarrollo. Sin embargo, aunque existen reportes en los que se describe un efecto protector contra enfermedades reumáticas mediante el tratamiento con anticuerpos neutralizantes contra el TNF α o la inyección de formas solubles de su receptor en las lesiones reumáticas (Pincus, T. y Callahan, L. F., 1995), hoy se sabe que el TNF α no es un requerimiento absoluto para la inducción de enfermedad autoinmune órgano-específica y que quizá sólo sea importante durante ciertas fases tempranas de la inducción de la enfermedad (Campbell, I. K. et al., 2001). Tanto el TNF α como otras citocinas inducen osteoclastogénesis (Zhang, Y. H. et al., 2001), lo que lleva a pensar que quizá el TNF α orquesta la disolución tisular y ósea que ocurre en las enfermedades inflamatorias como la artritis.

Otro padecimiento inflamatorio con el que se relaciona al TNF α es la enfermedad de Crohn, que actualmente se trata con terapias antiTNF α con resultados favorables (Sandborn, W. J., 2001). Actualmente, entre los

tratamientos más efectivos se encuentra la talidomida, que inhibe selectivamente la producción del TNF α (Bauditz, J. *et al.*, 2002).

b) Obesidad

A pesar del hecho de que esta citocina se relaciona con muchas de las anormalidades metabólicas que se asocian con caquexia, estudios recientes sugieren que el TNF α también tiene un papel central en la obesidad, ya que modula el gasto energético, la deposición lipídica y la resistencia a insulina.

En modelos de ratones obesos resistentes a insulina, la neutralización del TNF α en circulación restaura la captura de glucosa que media la insulina. En estudios con pacientes obesos se observó una conexión entre niveles del TNF α , la extensión de la obesidad y el nivel de hiperinsulinemia (Qi, C. y Pecala, P. H. , 2000).

Se observa una correlación entre el nivel de síntesis del TNF α en el tejido adiposo y el grado de adiposidad. Recientemente se reportó que el alelo A de un polimorfismo en la región que flanquea el extremo 5' del gen del TNF α (G-308A) es más frecuente en sujetos obesos que en sujetos normales y también se asocia con un aumento de la expresión de esta citocina en tejido graso e influye en la masa corporal y la resistencia a insulina (Brand, E. *et al.* , 2001) . Una forma del TNF α unida a membrana está presente en tejido adiposo y su producción es claramente mayor en los modelos de obesidad en ratón, así como en humanos obesos (Xu, H. *et al.*, 2002).

Estudios mecanísticos en cultivo celular sugieren que el TNF α causa resistencia celular a insulina a través de la regulación de la síntesis del transportador 4 de glucosa (Glut4) que responde a insulina, y también afecta la

autofosforilación del receptor de insulina y del sustrato uno del receptor de insulina (Coppack, S. W. , 2001).

En conjunto, los resultados de varios experimentos y estudios clínicos sugieren que el $\text{TNF}\alpha$ quizá actúa como un regulador auto/parácrino de la función del adipocito, lo cual sirve para limitar la expansión del tejido adiposo, probablemente por inducción de resistencia a insulina, lo cual a su vez causa perturbaciones metabólicas (Hube, F. y Hauner, H., 1999).

c) Organogénesis linfoide

Aunque a la familia de citocinas del $\text{TNF}\alpha$ -que incluye también linfotóxina alfa y beta- se le identificó inicialmente como mediadora de funciones inmunes efectoras, existe evidencia de que estas moléculas juegan papeles esenciales en la génesis normal de los órganos linfoides (Boehmer, H. von, 1997).

Específicamente, los ratones $\text{TNF}\alpha^{-}/\text{TNF}\alpha^{-}$ (deficientes homocigos) presentan resistencia al choque endotóxico, pero también ausencia de folículos linfoides en el bazo y de las células dendríticas foliculares maduras. Además, estos ratones no forman centros germinales después de una estimulación antigénica (Pasparakis, M. *et al.*, 1996). Al parecer, a diferencia del homotrímero de linfotóxina alfa ($\text{LT}\alpha$) y del heterotrímero de $\text{LT}\alpha$ y $\text{LT}\beta$, el $\text{TNF}\alpha$ no tiene un papel en la organogénesis linfoide como tal, sino en la formación de estructuras linfoides secundarias (Pasparakis, M. *et al.*, 1997). El conocimiento actual indica que el desarrollo y mantenimiento de las estructuras linfoides dependen de una compleja interacción entre el $\text{TNF}\alpha$ y las $\text{LT}\alpha$ y β , ya que muestran efectos complementarios en la formación de los centros

germinales y la presencia de las células dendríticas foliculares (Wang, Y. *et al.*, 2001).

d) Neuromodulación

Los resultados de experimentos en los que se bloquean los efectos del TNF α e IL-1 por diferentes medios, indican que estas citocinas también participan en la modulación de las funciones neurales en un organismo saludable. Hoy se conoce que el TNF α y otras citocinas alteran la regulación del sueño y se involucran en la plasticidad sináptica, la transmisión neural y la señalización por Ca²⁺ (Vitkovic, L. *et al.*, 2000). Esto significa que a sus funciones hay que sumar ahora un papel como neuromodulador.

3. Descripción molecular

a) Localización y estructura del gen

En humanos, el gen del TNF α (hTNF α) tiene tres intrones (Nedwin, G. E. *et al.*, 1985) y se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (cerca del centrómero, entre 6p21.1 y 6p21.3), contiguo al locus HLA-B en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (figura 1) (Spies, T. *et al.*, 1989). En el ratón, el contexto cromosomal del TNF α es muy similar; el gen del TNF α murino se encuentra en el cromosoma 17, cerca del *locus* H2-D, el equivalente murino de HLA-B (Muller, U. *et al.*, 1987). Este gen y los que codifican para las moléculas LT α y LT β se encuentran adyacentes dentro de la región de histocompatibilidad y presentan un alto grado de similitud entre sí.

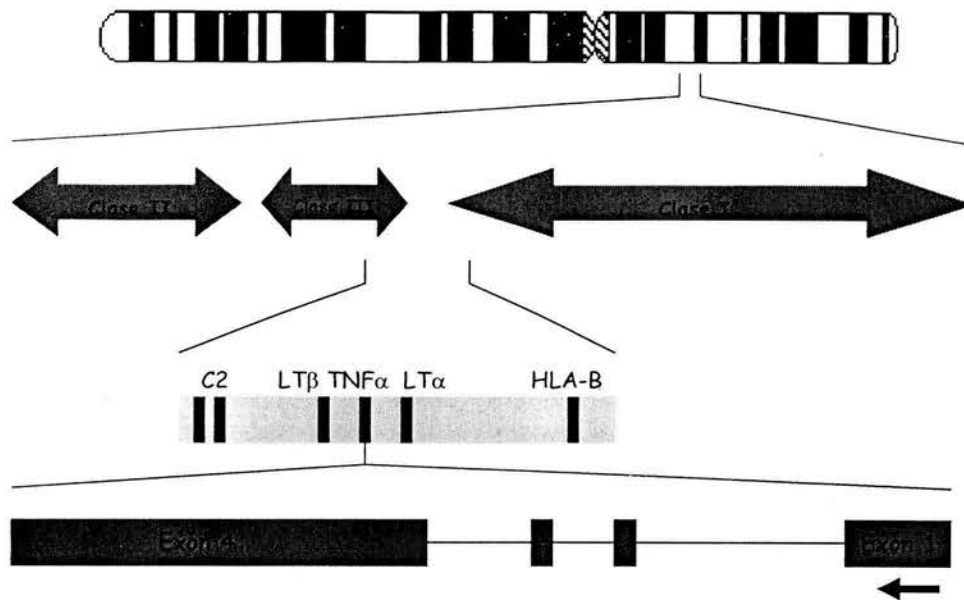


Figura 1. Estructura del gen de TNF α humano y localización dentro del locus del complejo mayor de histocompatibilidad en el brazo corto del cromosoma 6.

Los cuatro exones se distribuyen a lo largo de aproximadamente 3 kb de DNA. Más del 80% de la secuencia del TNF α maduro se codifica en el cuarto exón, mientras que los exones I y II codifican casi en su totalidad para la secuencia del péptido líder, que generalmente se procesa.

La región que flanquea el extremo 5' del gen del TNF α contiene, además de una caja TATA y una caja GC, sitios consenso de unión para varios factores de transcripción. La secuencia incluye sitios para NF- κ B, ATF-2, c-jun/AP-1, AP-2, SP-1, Krox-24 y NF-AT, una caja rica en purina (PU.1), un elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE). También está presente una "caja Y" similar a las de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, que suelen unir factores que tienen un efecto represor. En macrófagos, la producción del TNF α se regula por NF- κ B en respuesta al LPS y al propio TNF α (Shakhov, A. N. *et al.*, 1990) aunque actualmente se conoce que participan muchos otros

Factores transcripcionales. La propiedad de regulación positiva por el mismo TNF α es importante para la amplificación de las respuestas inflamatorias.

A nivel traduccional hay un punto posible de regulación a cargo de la secuencia rica en UA que se localiza en la región 3' que no se traduce del RNAm del TNF α humano. Este elemento afecta el control postranscripcional a través de la estabilidad del mensajero y la eficiencia de la traducción (Spriggs, D. F., 1992). Agentes como la tristetraprolina se unen a las regiones ricas en AU y promueven la desadenilación y la desestabilización del mensajero del TNF α (Lai, W. S. *et al.*, 1999).

b) Producción

El TNF α es una citocina que se produce normalmente en los fibroblastos, en las células endoteliales y mayoritariamente en los macrófagos activados, que en el caso del tratamiento con BCG y LPS son las células que la sintetizan como respuesta. Este factor también se produce en muchas otras células en pequeñas cantidades (tabla 1) y su inducción puede ocurrir a través de diversos estímulos, como infección viral (Aderka, D. *et al.*, 1986), LPS, TPA (Aggarwal, B. B. *et al.*, 1985b), citocinas, flujos de Ca²⁺ y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Valen, G. *et al.*, 1999).

Como se mencionó antes, el factor de transcripción NF- κ B influye en la expresión del TNF α en monocitos que se tratan con LPS, aunque no se tiene información en referencia a otros factores participantes y su mecanismo de regulación. Al parecer, la regulación trascricional del gen del TNF α no tiene un papel importante en la síntesis de la proteína; en cambio, su mensajero sufre un proceso de regulación que se denomina represión de la traducción que

consiste en el control de la cantidad y estabilidad de RNAm antes de que éste se convierta en proteína en los ribosomas que se asocian al retículo endoplásmico. La traducción del mensajero del TNF α se regula por la cinasa que se activa por estrés llamada p38, que también controla la estabilidad de otros mensajeros de proteínas proinflamatorias. La estimulación de los macrófagos con LPS estabiliza el RNAm del TNF α y este fenómeno se revierte al inhibir específicamente a p38. Esta cinasa también controla el recambio del mensajero, fenómeno que se asocia a la región rica en AU del extremo 3' que no se traduce (Brook, M. *et al.*, 2000). En los macrófagos, luego de la señal extracelular adecuada, el RNAm para el TNF α puede incrementarse hasta 100 veces y la biosíntesis hasta en 10,000 veces, gracias a la habilidad para hacer que el RNAm existente se estabilice y se traduzca en proteína. Cuando la señal extracelular concluye, se reinicia la represión de la traducción que conduce a un rápido declive en la tasa de biosíntesis del TNF α .

La conversión de la forma transmembranal del TNF α a la forma soluble es un proceso que se regula estrictamente y ocurre por un corte proteolítico entre la Ala76 y la Val77 del péptido señal, por una metaloproteinasa membranal llamada TACE (por TNF α -converting enzyme) (Mohan, M. J. *et al.*, 2002). Los mediadores de la activación de los monocitos aumentan la tasa de conversión del TNF α , y se sabe que esto lo regulan las cascadas de cinasas (Black, R. A., 2002). Algunos estudios recientes identificaron a TACE como sustrato de la cinasa que se regula por las señales extracelulares (Erk) y también mostraron que tanto la fosforilación de TACE en la treonina 735, como su interacción con Erk son importantes para la regulación de su actividad, probablemente durante el proceso de maduración de TACE (Díaz-Rodríguez, E. *et al.*, 2002).

Tabla 1. Producción y presencia del TNF α en humanos.

Fuentes principales <i>in vivo</i>	Monocitos/macrófagos estimulados ¹ , fibroblastos ² y células endoteliales ³
Células que lo producen después de estimulación o bajo ciertas condiciones	Linfocitos T ⁴ y B ⁵ , granulocitos ⁶ , neutrófilos ⁷ , eosinófilos ⁸ , condrocitos ⁹ , osteoblastos ¹⁰ , células mastoides ¹¹ , células gliales ¹² , adipocitos ¹³ , cardiomiocitos ¹⁴ , queratinocitos ¹⁵ y miocitos de músculo esquelético ¹⁶
Fluidos corporales en que se detecta	Líquido cerebroespinal ¹⁷ , leche humana ¹⁸ y transitoriamente en suero al inicio del choque séptico ¹⁹

¹Sweet, M. J. y Hume, D. A., 1996; ²Havell, E. A. y Rogerson, B. J., 1993; ³Shanahan, W. R. Jr, *et al.*, 1989; ⁴Romagnani, S., 2000; ⁵Pistoia, V. y Corcione, A., 1995; ⁶Peters, P. M. *et al.*, 1986; ⁷Van Dervort, A. L. *et al.*, 1994; ⁸Molet, S. *et al.*, 1998; ⁹Shinmei, M. *et al.*, 1991; ¹⁰Marie, P. J. *et al.*, 1993; ¹¹Galli, S.J. *et al.*, 1993; ¹²Pan, W. *et al.*, 1997; ¹³Coppack, S. W. , 2001; ¹⁴Kalra, D. *et al.*, 2002; ¹⁵Ansel, J. *et al.*, 1990; ¹⁶Li, Y. P. y Reid, M. B., 2001; ¹⁷Ross, S. A. *et al.*, 1994; ¹⁸Srivastava, M. D. *et al.*, 1996; ¹⁹Pinsky, M. R., 1994.

b) Estructura de la proteína

El cDNA del gen del TNF α codifica para un polipéptido de 17 Kd, con punto isoeléctrico cercano a 5.6, antecedido por una larga presecuencia de 76 aminoácidos. En el caso de que esta última no se procese, el pro-TNF α (26 Kd) permanece unido a la cara externa de la membrana celular como una glicoproteína tipo II con el extremo amino en la región citoplásmica y el carboxilo en la extracelular (Massagué, J. y Pandeilla, A., 1993). Los aminoácidos -44 a -26 de la presecuencia del TNF α comprenden la región hidrofóbica transmembranal y los residuos -76 a -50 constituyen un dominio intracitoplásmico. La mayoría de los efectos biológicos los lleva a cabo la

forma procesada (codificada mayoritariamente en el cuarto exón) que forma un trímero con una masa molecular total de 52 Kd. La oligomerización de la citocina depende de la concentración de proteína y al parecer, interacciones tanto hidrofóbicas como electrostáticas son responsables de su formación (Smith, R. A. y Baglioni, C., 1987). Cada subunidad presenta únicamente un puente disulfuro y consiste en un "sandwich" que se forma por dos láminas β antiparalelas que se doblan en forma similar a la estructura cristalográfica denominada "jelly roll", característica de las proteínas de las cápsides virales. Las subunidades se asocian por empaquetamiento de las láminas β "canto con cara" de tal manera que se forma un trímero compacto de forma cónica un poco más angosta en la región de los puentes disulfuro y más ancha en la zona donde se encuentran los extremos amino y carboxilo de las subunidades (Jones, E. Y. *et al.*, 1989) (figura 2). El pro-TNF α transmembranal humano también tiene una estructura trimérica que se ensambla intracelularmente antes de transportarse a la superficie. La formación del trímero es un requisito para su actividad biológica, igual que para el TNF α maduro (Tang, P. *et al.*, 1996).

La secuencia primaria del TNF α muestra varios sitios consenso de fosforilación, aunque sólo se reportan efectos que se asocian a la fosforilación de la citocina unida a membrana (Watts, A. D. *et al.*, 1999).

El TNF α forma parte de la superfamilia de ligandos que incluye a FasL (ligando de Fas), LT α y β , RANKL (ligando de RANK), TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF α) y otros (Smith, C. A., *et al.*, 1994). En el caso de FasL, CD40L y algunos miembros de la familia de TRAIL se encontró que activan mecanismos proapoptóticos a través de sistemas de transducción semejantes a los que evoca el TNF α (Dempsey, P. W. *et al.*, 2003).

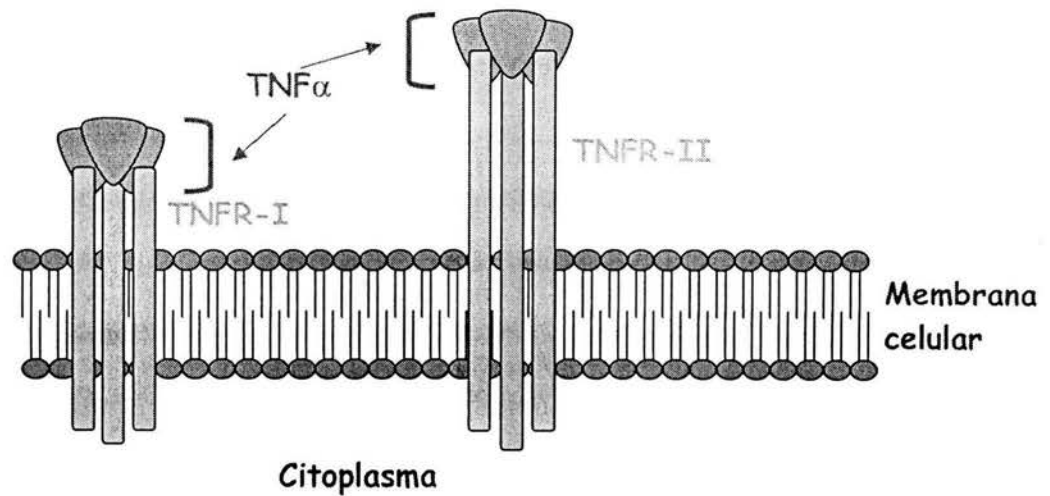


Figura 2. Esquema de la unión del trímero del TNF α a sus dos receptores también triméricos.

4. Receptores

El homotrímero del TNF α se une a dos tipos de receptores, que se denominan p55 o tipo I y p75 o tipo II, con afinidades (K_d) muy similares (0.5 y 0.1 nM para el tipo I y II respectivamente). Estos receptores también pueden unir a la linfoxina alfa (también llamada TNF β), una citocina, que como ya se mencionó, se relaciona genética, estructural y funcionalmente con el TNF α (Agarwal, B. B. *et al.*, 1985). Los dos receptores se encuentran presentes en todos los tipos celulares que se conocen y su número varía entre 100 y 10,000 por célula, lo que implica que la mayoría de las células tiene la capacidad de responder a esta citocina.

El receptor tipo I (TNFR-I) consta de 434 aminoácidos, con una estructura típica para un receptor de superficie celular: una secuencia líder hidrofóbica y una región transmembranal que separa los dominios extra e intracelulares. El receptor tipo II (TNFR-II) es una proteína transmembranal

de 439 residuos de aminoácidos (Loetscher, H. *et al.*, 1990a; Smith, C. A. *et al.*, 1990).

Cada molécula contiene varios puentes disulfuro esenciales para su actividad. Ambos receptores son glucoproteínas transmembranales de tipo I (Loetscher, H. *et al.*, 1990b), pero al parecer las glucosilaciones no se requieren para la unión al ligando ni para la inducción de las respuestas celulares dependientes de la unión ligando-receptor. Tanto el TNFR-I como el TNFR-II presentan N-glucosilaciones, pero sólo el TNFR-II está O-glucosilado. La secuencia primaria del TNFR-I indica la presencia de sitios consenso de fosforilación potencial.

Los receptores se autoasocian, por medio de la región PLAD (pre-ligand binding assembly domain) como homotrímeros, lo que lleva a que el trímero del TNF α se una a tres moléculas del receptor, una en cada una de las interfaces entre los monómeros del TNF α (figura 2) (Smith, R. A. y Baglioni, C., 1989). La unión del ligando involucra un rearrreglo de estas cadenas preensambladas (Chan, F. K. *et al.*, 2000). El TNFR-I y el TNFR-II muestran la más alta similitud (28%) en su dominio extracelular, el de unión al TNF α , y son completamente distintos en sus porciones intermembranal y citosólica, lo que lleva a proponer que activan vías de transducción distintas. Ningún tipo de receptor del TNF α , ni de ninguno de los receptores de la familia del TNF α , tiene actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina, serina o treonina. Después de la unión del TNF α al receptor, este complejo se internaliza vía vesículas cubiertas de clatrina y posteriormente se degrada en lisosomas secundarios, de tal manera que al parecer se requiere la síntesis *de novo* para recuperar los receptores en la membrana celular (Baglioni, C. *et al.*, 1985; Tsujimoto M. *et al.*, 1985). Este mecanismo de degradación de los receptores

que se ocupan asegura una rápida desensibilización. Si la internalización del ligando es o no un prerequisite para la inducción de las respuestas celulares al $\text{TNF}\alpha$ aún genera controversias. Un reporte de Smith *et al.* (1990) muestra que el $\text{TNF}\alpha$ que se microinyecta tiene actividad citotóxica, lo que significa que para estas respuestas, los receptores quizá sirvan como transportadores del ligando, además de funcionar como transmisores de la señal en la membrana.

Ambos receptores pertenecen a una superfamilia -que incluye FAS, CD40, CD27, RANK y otros (ver tabla 2)- definida por la presencia de dominios ricos en cisteínas, que forman puentes disulfuro esenciales para su actividad, que se localizan en el dominio extracelular amino terminal (Bazzoni, F. y Beutler, B., 1996). Los dominios son pseudorepeticiones de aproximadamente 40 aa que incluyen de 2 a 6 cisteínas (Smith, C. A., *et al.*, 1994). Algunos de los miembros de la familia, entre los que se encuentra el TNFR-I, presentan un dominio de interacción proteica que se denomina dominio de muerte (DD, por death domain). Su nombre se deriva del hecho de que al eliminarse, la respuesta citotóxica al $\text{TNF}\alpha$ o al ligando de Fas se pierde, lo que demuestra la importancia de esa secuencia en la señalización de la muerte de esta familia de receptores (Ashkenazi, A. y Dixit, V. M., 1998). Este dominio permite la formación de homo y heterodímeros entre las proteínas que lo presentan y se encuentra en proteínas que no necesariamente participan en la señalización de la muerte celular (Feinstein, E. *et al.*, 1995).

Mientras el gen para el TNFR-I se expresa constitutivamente en bajos niveles, la transcripción del gen del TNFR-II se modula fuertemente por varios agentes estimulantes. En la región que flanquea el extremo 5' del gene del TNFR-II se identificaron sitios de unión al DNA para algunos factores de

transcripción, como Sp1, CREB, Yi, YY1 y el elemento que responde al IFN γ (Seitz, C. *et al.*, 1998).

5. Efectos celulares

El TNF α tiene efectos pleiotrópicos sobre distintos tipos celulares que incluyen citostasis, citotoxicidad, diferenciación, desdiferenciación y activación. Aunque el TNFR-II parece contribuir de forma importante en varias respuestas de tipos celulares específicos -*v. gr.* la proliferación de linfocitos T (Kim, E. Y. y Teh, H. S., 2001)-, en la mayoría de las células los efectos inducidos por el TNF α ocurren a través del TNFR-I.

a) *Activación*

In vitro, algunos de los efectos más sobresalientes del TNF α sobre las células primarias consisten en la activación de los monocitos periféricos, de las células de Kupffer y de los astrocitos primarios, así como de las células endoteliales y los fibroblastos de lesiones reumáticas; en todos estos casos el TNF α promueve la expresión de marcadores característicos en estos tipos celulares durante una respuesta celular inmune o durante la reacción inflamatoria aguda o crónica. Muchos de los efectos de activación *in vitro* parecen reproducir el papel del TNF α en la respuesta inflamatoria *in vivo* (Libetta, C. *et al.*, 1996).

Tabla 2. Familia de receptores del TNF-RI y ligandos de la familia del TNF α (Bodmer, J. L. *et al.*, 2002).

Ligando	Receptor
RANKL	RANK
TNF α	TNFR-I, TNFR-II
LT α	TNFR-I, TNFR-II, HVEM
LT α 1 β 2	LT β -R
CD95	CD95R(Fas, Apo-1)
TRAIL (Apo2L)	TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3. TRAIL-R4
BAFF	BAFF-R, BCMA, TACI
GITRL	GITR
BlyS	BlyS-R
APRIL	BCMA, TACI
CD40L	CD40
CD27L	CD27
	DR6
	DR3 (TRAMP)
EDA-A1	EDAR
EDA-A2	XEDAR
TWEAK	Fn14
	NGFR
LIGHT	LT β -R, HVEM
CD30L	CD30
4-1BBL	4-1BB
OX40L	OX40
GITRL	GITR
	TROY
	RELT

b) Efectos que se asocian a la caquexia y la diabetes

Los efectos *in vitro* del TNF α que se relacionan con el fenómeno de caquexia se estudian primordialmente sobre las células de músculo esquelético y en adipocitos.

El TNF α puede actuar directamente sobre las células musculares para estimular la pérdida proteica, una acción que media el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B). Los pasos intermedios en la señalización de la vía TNF α /NF- κ B incluyen la estimulación del TNFR-I y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por reactive oxygen species) que se derivan del transporte de electrones mitocondrial. El tratamiento con el TNF α de miotubos diferenciados estimula, de forma dependiente del tiempo y de la concentración, la reducción de contenido proteico total y la pérdida de la cadena pesada de miosina adulta (MHCf) (Li, Y. P. *et al.*, 1998). El NF- κ B parece aumentar la actividad de la vía ubiquitina/proteasoma, que acelera la degradación regulada de las proteínas musculares (Reid, M. B. y Li, Y. P., 2001).

En miocitos C2C12 en proceso de diferenciación, la activación del NF- κ B que induce el TNF α inhibe la diferenciación muscular y abate el RNAm de MyoD, uno de los principales factores maestros que controlan la diferenciación del músculo esquelético (Guttridge, D. C. *et al.*, 2000).

En otro tipo celular, la línea L6, el TNF α inhibe la diferenciación muscular a través de la activación de caspasas en ausencia de apoptosis. Estos efectos son dependientes de la expresión de PW1 y son independientes de la activación del NF- κ B (Coletti, D. *et al.*, 2002).

En los miocitos primarios los efectos del $\text{TNF}\alpha$ incluyen un aumento en la glucólisis, la degradación de glucógeno y la utilización de fosfocreatina (Lee, M. D. *et al.*, 1987; Zentella, A. *et al.*, 1993).

En cuanto a sus efectos sobre los adipocitos, el $\text{TNF}\alpha$ inhibe la diferenciación de sus células precursoras (Petruschke, T. y Hauner, H., 1993). El $\text{TNF}\alpha$ también induce apoptosis *in vitro* de los preadipocitos y los adipocitos humanos (Prins, J. B. *et al.*, 1997) y el tratamiento con esta citocina por más de 72 h causa desdiferenciación de los adipocitos, como se evidencia por la pérdida de triglicéridos y la regulación negativa de marcadores específicos. La activación del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en los adipocitos 3T3-L1 es necesaria tanto para la supresión, que media el $\text{TNF}\alpha$, de genes específicos del estado diferenciado, como para la activación de genes de preadipocitos (Ruan, H. *et al.*, 2002).

El tratamiento prolongado de adipocitos de rata con el $\text{TNF}\alpha$ aumenta la lipólisis a través de un mecanismo que se media en parte por la regulación negativa de proteínas G inhibitorias (G_i) (Botion, L. M. *et al.*, 2001).

En un efecto que se relaciona directamente con la diabetes, el $\text{TNF}\alpha$ afecta el metabolismo de la glucosa ya que causa un aumento de la incorporación basal en las células musculares y una disminución de la incorporación en los adipocitos (Ranganathan, S. y Davidson, M. B., 1996).

c) *Efectos antitumorales*

El $\text{TNF}\alpha$ inhibe la proliferación de algunas líneas celulares tumorales (Nakajima, Y. *et al.*, 1995; Engers, R. *et al.*, 1996; Sugarman, B. J. *et al.*, 1985) y la capacidad de crecimiento clonogénico de células que se derivan de tumores de leucemias (Helseth, E., *et al.*, 1989; Beran, M. *et al.*, 1988). Asimismo, induce

citotoxicidad en líneas tumorales como los promielocitos humanos U937 y la línea MCF-7, que se derivó de un tumor de mama (Soranzo, C. *et al.*, 1990) (Flick, D. A. y Gifford, G. E., 1984), así como en cultivos primarios de las células cancerosas (Watanabe, N. *et al.*, 1985).

Dado que los dos receptores del TNF α se coexpresan en la mayoría de las células que se analizaron hasta ahora, la multitud de cambios fenotípicos y funcionales que induce el TNF α , o en su caso, la ausencia de cambios fenotípicos evidentes, seguramente dependen de una diversificación de los mecanismos de señalización posteriores al receptor y a diferencias en el patrón de expresión de las proteínas que participan en los procesos de transducción.

6. Señalización de la muerte celular

Un hecho llamativo es que en general las células primarias y las líneas celulares no transformadas son resistentes a los efectos citotóxicos del TNF α . En líneas celulares transformadas por mutagénesis química o provenientes de tumores, el TNF α puede inducir la muerte celular tanto necrótica como apoptóticamente. Entre estas dos formas de muerte existen diferencias morfológicas clave, ya que la apoptosis causa contracción del volumen celular, compactación de la cromatina y fragmentación de la célula en pequeñas vesículas fácilmente fagocitables, mientras que la necrosis involucra aumento del volumen celular con degeneración de los organelos y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Kerr, J. F. *et al.*, 1972). Molecularmente, la apoptosis involucra vías evolutivamente conservadas de

activación secuencial de un grupo de proteasas que se denominan caspasas, pero los mecanismos que llevan a la necrosis están menos definidos.

a) Sucesos próximos al receptor

Como ya se mencionó anteriormente, dado que los receptores del TNF α no tienen ninguna capacidad catalítica para transducir la señal que se genera por la unión del ligando, deben unir proteínas intracelulares para inducir la señalización en las células blanco.

La unión del ligando a sus receptores, ambos triméricos, induce el reclutamiento de varias proteínas de señalización en los dominios citoplásmicos de los receptores, lo que ocurre de manera extremadamente rápida y muy específica.

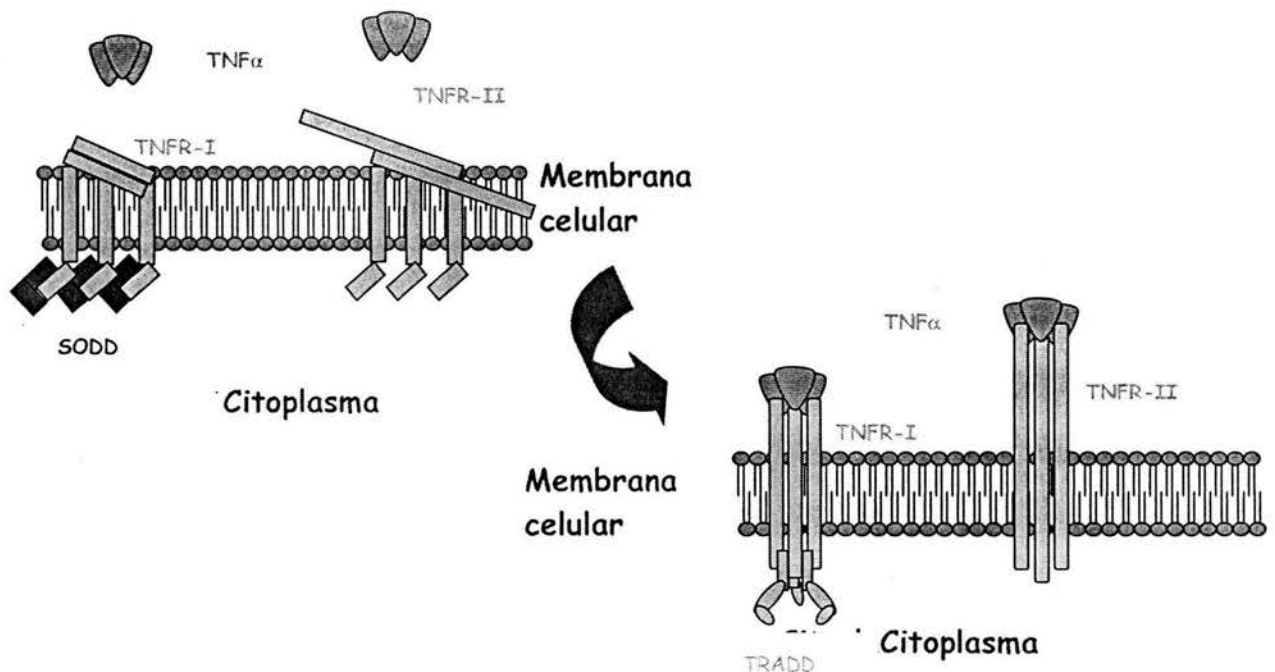


Figura 3. Primer paso para la formación de los complejos de señalización del TNFR-I que induce el ligando.

La proteína SODD es un silenciador de dominios de muerte (DD) que se une al DD del TNFR-I, cuando no está presente el TNF α en el medio externo, e impide la interacción de éste con otras proteínas que presentan DD. El SODD se disocia del TNFR-I inmediatamente después de la estimulación con el TNF α lo que permite que las proteínas activadoras accedan al dominio de muerte del receptor (Jiang, Y. *et al.*, 1999). La primera proteína que recluta el TNFR-I (figura 3) es la proteína asociada al dominio de muerte del TNFR-I (TRADD, por TNFR-I-associated death domain protein), la cual sirve como plataforma para reclutar al menos tres mediadores adicionales: la proteína 1 de interacción con el receptor (RIP1, por receptor-interacting protein), la proteína asociada al dominio de muerte de Fas (FADD, por Fas-associated death domain protein) (figura 4) y el factor 2 asociado al receptor del TNF α (TRAF2, por TNF-receptor-associated factor 2) (Hsu, H, *et al.*, 1996a; Hsu, H, *et al.*, 1996b). El TRAF2 también se asocia de manera trimérica a través de su extremo carboxilo y la sobreexpresión del TRAF2 es suficiente para activar vías posteriores de señalización aún en ausencia del TNF α .

La ocupación del TNFR-II resulta en el reclutamiento directo del TRAF2, el cual a su vez recluta al TRAF1. Aunque los TRAF1 y 2 se descubrieron originalmente a causa de su reclutamiento por el complejo de señalización del TNFR-II, ni los mecanismos de formación del complejo del TNFR-II activado, ni sus mecanismos de señalización se conocen.

Hasta la fecha se conocen seis diferentes isoformas de los TRAFs, todas se caracterizan por la presencia de un dominio proteico que se denomina anillo de dedo (ring finger) y por uno o más dominios llamados dedos de zinc en el extremo amino y un dominio en la región del extremo carboxilo que es responsable de la autoasociación e interacciones proteicas (Aggarwal, B. B.,

2000). No todas interaccionan con los TNFR, algunas como el TRAF6 son indispensables en la transducción de receptores de la familia de receptores similares al Toll TLR, como el TLR2 o el TLR4.

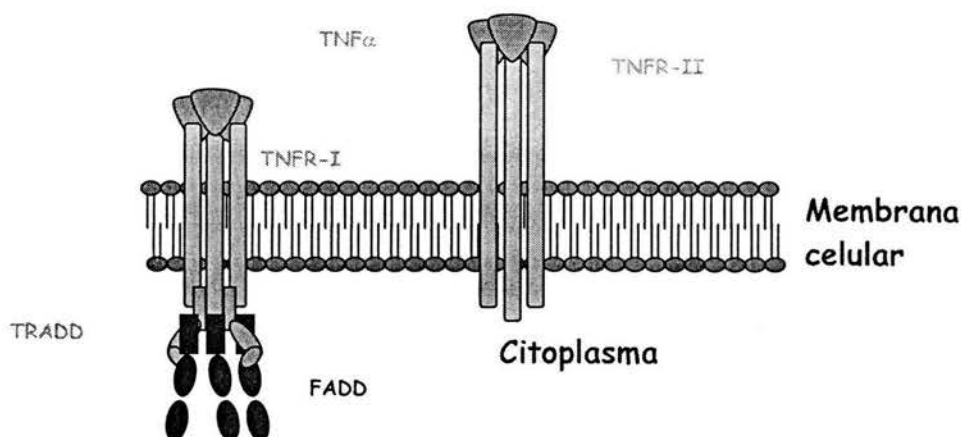


Figura 4. Interacción entre los trímeros de la TRADD y la FADD, proceso indispensable en la señalización de la muerte.

b) Cambios en la expresión génica

Un suceso temprano (minutos) en respuesta al TNF α es la activación del factor transcripcional NF- κ B, que promueve cambios en la expresión génica de las células que se tratan con esta citocina. La sobreexpresión del TRAF2, molécula que se asocia a la TRADD, provoca la activación del NF- κ B, mientras que una mutante dominante negativa del TRAF2 bloquea la activación del factor de transcripción que media el TNFR-II (Rothe, M., *et al.*, 1995).

La activación del NF- κ B, en respuesta al TNF α , implica la fosforilación de distintos inhibidores llamados I κ B's por un complejo de cinasas denominado IKK, lo que provoca la ubiquitinación y subsiguiente proteólisis del inhibidor. Los I κ B's mantienen ocultas las secuencias de destino nuclear del NF- κ B, por lo

que retienen al factor de transcripción en el citoplasma. La degradación del inhibidor lleva a la liberación del factor transcripcional y permite su traslocación al núcleo (Karin, M. y Ben-Neriah, Y., 2000). La activación del IKK depende tanto del TRAF2 como de la RIP1; la función del TRAF2, que se sustituye por el TRAF5, consiste en reclutar al complejo IKK (IKK α , β y γ) hacia el receptor y parece involucrar la función de ligasa de la proteína ubiquitina en el dominio de anillo de dedo del TRAF2. Dos cinasas membranales la MEKK1 y la NIK (cinasa inductora de NF- κ B), se involucran en hacer llegar la señal al complejo IKK. El TRAF2 interactúa directamente con la NIK y muy posiblemente la activa (Malinin, N. L. *et al.*, 1997).

Por otra parte la RIP1 interactúa con la subunidad reguladora del complejo IKK que se denomina IKK γ /NEMO, lo que facilita la oligomerización del complejo (Inohara, N. *et al.*, 2000).

Una vez en el núcleo, la actividad transcripcional del NF- κ B puede modularse a través de fosforilación por varias cinasas del subgrupo p38 de las MAPKs (cinasas de proteínas activadas por mitógeno).

Como parte de una vía de transducción del TNF α para activar al NF- κ B de manera independiente de la activación del IKK, se involucra a la cinasa de residuos de serina y treonina Akt, que es el blanco de la cinasa de 3-fosfatidil inositol (PI(3)K). La importancia de esta vía paralela de activación del NF- κ B se pone en evidencia al inhibirla, tanto la wortmannina (un inhibidor de la PI(3)K), como formas dominantes negativas de la PI(3)K o formas de la Akt sin actividad de cinasa que inhiben la activación del NF- κ B que media el TNF α (Ozes, O. N. *et al.*, 1999).

Otras moléculas que participan en la regulación de este proceso son el I-TRAF y el Stat1. El I-TRAF, es una proteína que se une al dominio

conservado TRAF-C de los TRAFs que se conocen. La sobreexpresión del I-TRAF inhibe la activación del NF- κ B que media el TRAF2 (Rothe M. *et al.*, 1996). El Stat1 interactúa directamente con el TNFR-I y la TRADD. El Stat1 actúa en la señalización del TNFR-I para suprimir la activación del NF- κ B. Al unirse directamente al complejo TNFR-I/TRADD/FADD, el Stat1 previene la asociación al mismo del TRAF2 y la RIP (Wang, Y. *et al.*, 2000).

Tanto la sensibilidad al TNF α como la cinética de la muerte que induce la citocina se potencia en muchos tipos celulares que expresan una forma mutante del I κ B α que no puede degradarse y que por tanto no puede liberar al NF- κ B. Estos hallazgos sugieren que el TNF α activa simultáneamente procesos de muerte y de sobrevivencia. Así, el TNF α induce un mecanismo de retroalimentación negativa por el que la activación del NF- κ B bloquea las señales para la muerte celular (Van Antwerp, D. J. *et al.*, 1996). La activación del NF- κ B regula positivamente un inhibidor de la caspasa 8, que se denomina FLIP, lo que resulta en un aumento de la resistencia al efecto citotóxico del TNF α . De hecho, el restablecimiento de dos formas alternas del FLIP, en las células sin el NF- κ B, inhiben eficientemente la muerte celular que induce el TNF α (Micheau, O. *et al.*, 2001). Otra proteína que cuya transcripción se induce por el NF- κ B es NDED; este factor suprime la apoptosis que media el TNF α mediante la inhibición de la actividad de la caspasa 8, aunque a diferencia del FLIP, no lleva a cabo ningún procesamiento sobre esta caspasa (You, Z. *et al.*, 2001). Estos resultados podrían explicar la protección que se observa cuando las células susceptibles al efecto citotóxico del TNF α se pretratan con concentraciones subletales del TNF α .

Además de promover la activación del NF- κ B, el TRAF2 enciende simultáneamente otras vías de transducción, aún no bien definidas, que también suprimen las señales de la muerte (Lee S. Y., *et al.*, 1998).

El TNF α activa también al AP-1, una colección heterogénea de factores de transcripción que contienen las subunidades Jun, Fos y ATF. La actividad de éstas se regula por múltiples mecanismos que incluyen cambios en su estado de fosforilación. Especialmente relevante en la inducción del AP-1 por el TNF α es la cinasa JNK, que fosforila el amino terminal del c-Jun.

Tanto la RIP como el TRAF2 median la activación de la JNK y del complejo IKK. La activación de ambos sistemas requiere los motivos anillo de dedo y dedo de zinc del TRAF2 (Baud, V. *et al.*, 1999) y es dependiente del dominio de asociación proteica presente en su extremo carboxilo. Estas dos respuestas, que afectan el patrón de la expresión génica, divergen más allá del TRAF2 y además, a diferencia de lo que ocurre con el NF- κ B, la activación de la JNK no parece involucrarse ni en inducción ni en la protección de la muerte (Liu, Z. G., *et al.*, 1996) (figura 5).

c) Vías específicas de la muerte apoptótica

Las caspasas, cisteín-proteasas ácidas que procesan proteínas celulares específicas después de residuos de aspartato, juegan un papel crítico en los procesos de la muerte celular apoptótica. Éstas, al igual que la inmensa mayoría de proteasas, se producen como precursores inactivos o zimógenos y se activan por cortes proteolíticos a raíz de la inducción de la muerte. Además de la region homóloga en el extremo carboxilo a partir de la cual se derivan las proteasas maduras, las proteínas precursoras contienen regiones únicas en su

extremo amino. Interacciones de estos prodominios con moléculas reguladoras específicas permiten la activación diferencial y controlada de cada caspasa por diferentes señales inductoras de la muerte.

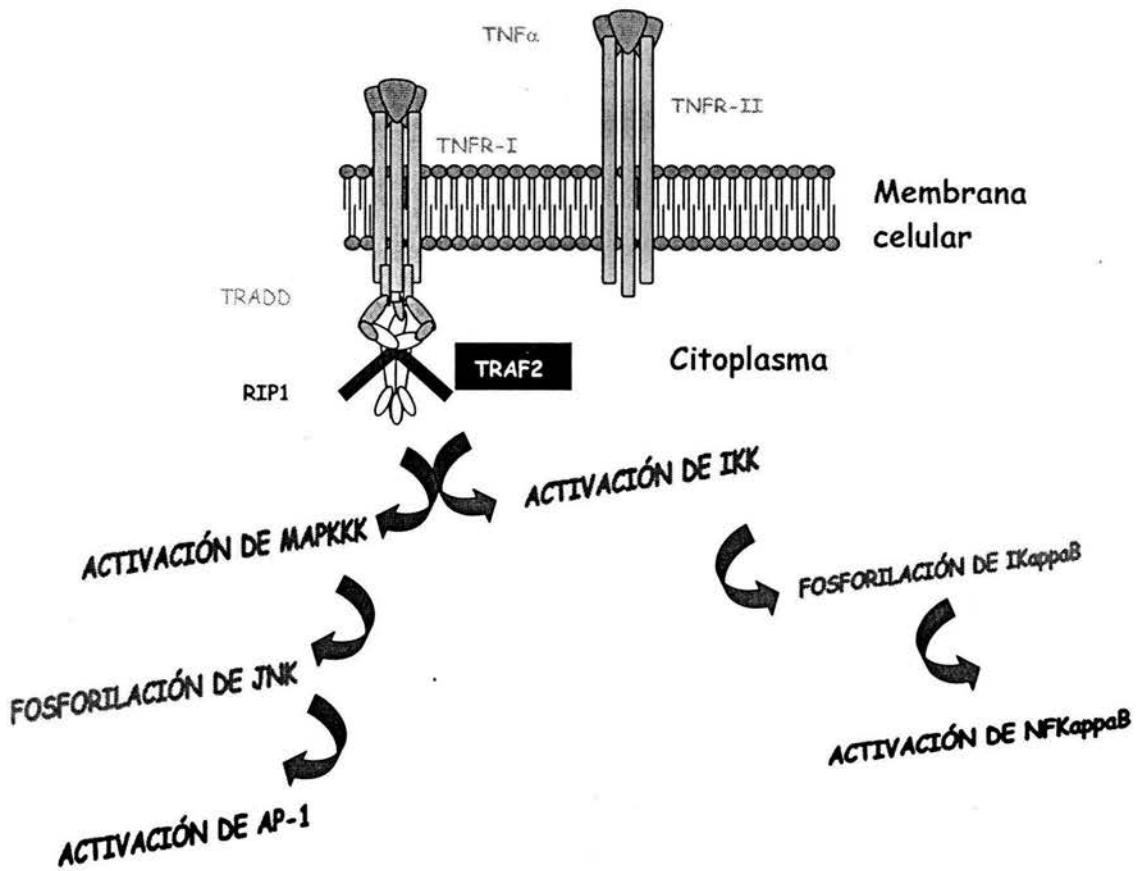


Figura 5. Reclutamiento del complejo que lleva a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B.

Se cree que el papel de la FADD/MORT1 en la apoptosis que induce el TNF α es el reclutamiento de la procaspasa 8 y su subsecuente activación

(Boldin, M. P. *et al.*, 1996). Esta interacción involucra un motivo de unión entre proteínas llamado dominio efector de la muerte (DED), que se localiza tanto en el extremo amino de la MORT1/FADD como en los prodominios de las procaspasas 8 y 10. La caspasa 8 activa, cuya función es necesaria y no redundante en la inducción de la muerte apoptótica por el TNF α (Varfolomeev, E. E. *et al.*, 1998), inicia entonces una cascada de activación de caspasas que resulta en apoptosis (figura 6). Al complejo que forman los receptores, la TRADD, la FADD y la procaspasa 8 también se le denomina DISC (por death-inducing signaling complex).

Uno de los blancos de la caspasa 8 es BID, miembro de la familia de Bcl-2 (que incluye proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas). El tratamiento con el TNF α induce un corte específico, que media la caspasa 8, de la forma citosólica de la proteína BID; el producto p15 resultante se trasloca a la mitocondria como una proteína integral de membrana y promueve la liberación del citocromo c de este organelo (Gross, A. *et al.*, 1999). En presencia del citocromo c (que se denomina también Apaf2), la procaspasa 9 y una molécula llamada Apaf1 (por apoptotic protease-activating factor 1) se unen vía dominios homólogos de interacción proteica que se localizan en sus respectivos extremos amino, lo que lleva al procesamiento de la procaspasa y se produce la forma activa de la caspasa 9. La caspasa 9 a su vez corta y activa a la precaspasa 3 lo que culmina la cascada de activación de caspasas (Li, P. *et al.*, 1997).

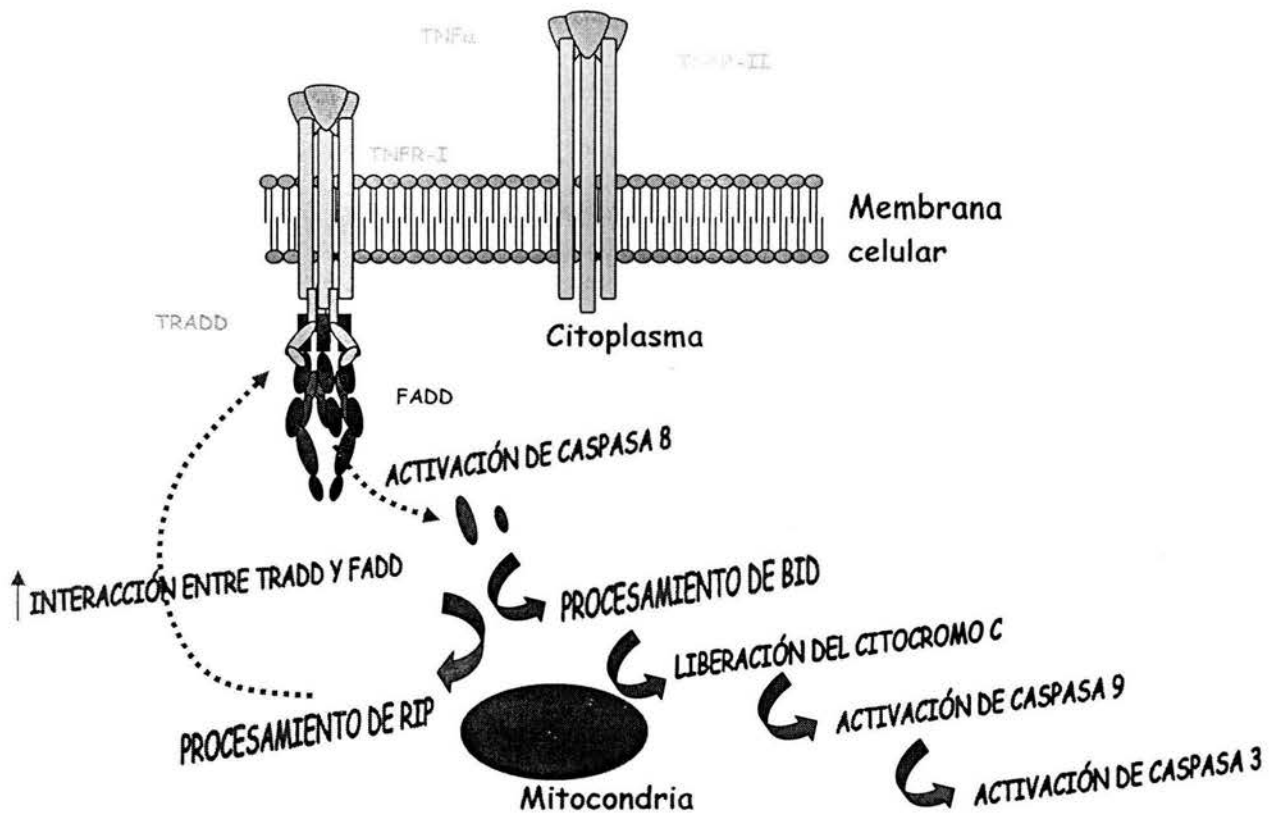


Figura 6. Complejo que se une al receptor tipo I y cadena de activación que lleva a la muerte apoptótica.

Uno de los sustratos mejor caracterizados de la forma activa de la caspasa 3 es la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1). La PARP-1 es una enzima abundante que se asocia a la cromatina; después de unirse a cortes en la cadena de DNA se automodifica por transferencia de polímeros grandes y con ramificaciones de poli(ADP-ribosa) al utilizar NAD^+ como sustrato. La reparación del DNA, que se asocia con esta enzima, ocurre después de que la PARP-1 modificada se disocia de los cortes en la cadena. Se sabe que la PARP-1 no participa directamente en este proceso (Lindahl, T. *et al.*, 1995). El procesamiento por la caspasa 3 de la forma de 116 kDa en el sitio DEVD de PARP-1 genera un fragmento de 85 kDa y otro de 24 kDa (Kaufmann, S. H. *et al.*, 1993). Este corte en PARP-1 resulta en la separación de los dos motivos de

unión a DNA de los dominios de automodificación y catálisis, lo que evita el reclutamiento de la enzima a los sitios de DNA dañado. Por su parte, la forma automodificada de la PARP-1 es sustrato *in vivo* de la caspasa 7. El corte proteolítico que lleva a cabo la caspasa 7 también inactiva rápidamente a la PARP-1 (Germain, M. *et al.*, 1999).

La única cinasa de dominios de muerte que se recluta al complejo activado del TNFR-I es la RIP, que se procesa en el residuo de ácido aspártico 324 por la caspasa 8 durante la apoptosis que induce el TNF α . El corte de la RIP resulta en el bloqueo de la activación del NF- κ B que induce el TNF α . La RIPc, uno de los productos de corte, potencia la interacción entre la TRADD y la FADD/MORT1 y aumenta la sensibilidad celular al TNF α . Por otro lado, las mutantes de la RIP resistentes a la caspasa 8 protegen a las células de la apoptosis que causa el TNF α . Estos resultados sugieren que el procesamiento de la RIP es un paso importante en la muerte que induce el TNF α , que favorece la vía de muerte que median las caspasas sobre la de sobrevivencia que media el NF- κ B. (Lin, Y. *et al.*, 1999).

Tanto el TRAF2 como el TRAF1 se implican en la supresión de la apoptosis que media el reclutamiento de miembros de la familia de inhibidores de apoptosis c-IAP a los receptores tipo I (TRAF2) y tipo II (TRAF1). Al parecer estas interacciones inhiben la apoptosis ya que bloquean el acceso de la caspasa 8 al complejo del receptor tipo I (figura 7).

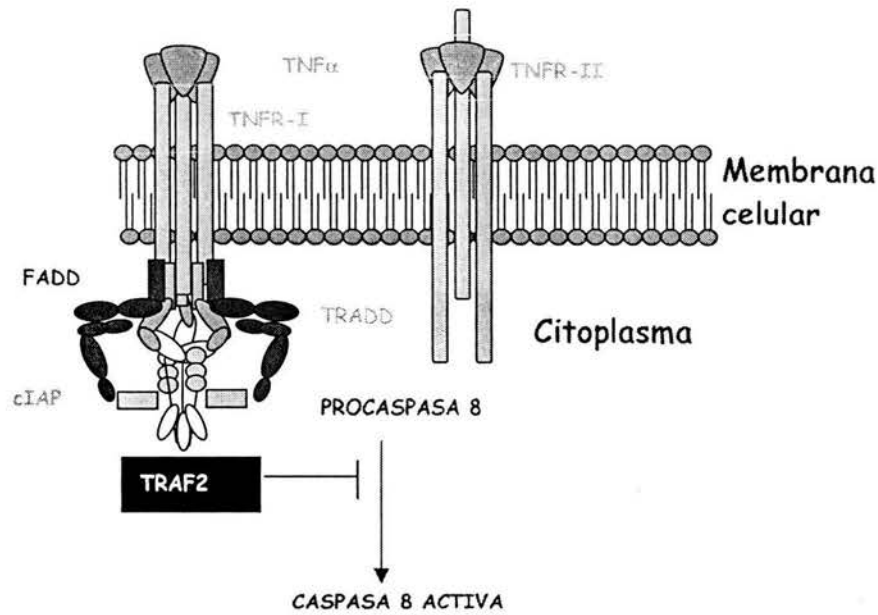


Figura 7. Inhibición del complejo que se une al receptor tipo I por cIAP/TRAF2.

La vía de transducción de algunos miembros de la familia de proteínas cinasas C (PKCs) también participa en la regulación la muerte celular que causa el TNF α . La inducción o sobreexpresión de la isoforma PKC η correlaciona con la protección contra la citotoxicidad del TNF α en las células MCF-7. Al parecer, la PKC η produce este efecto al prevenir la activación de las caspasas 8 y 7 (Akkaraju, G. R. y Basu, A., 2000).

d) *Señalización de la muerte no específicamente apoptótica*

Ceramida. El TNF α causa la activación de al menos dos esfingomielinasas (SMasas) que hidrolizan la esfingomielina y generan la ceramida y la fosfolina. Diversas evidencias sugieren que la activación de la SMasa requiere de la activación de la PLA2 y la consecuente generación del ácido araquidónico (Jayadev *et al.*, 1994).

El TNFR-I activa a estos dos tipos de SMasas a través de distintos dominios citoplásmicos. Dado que tanto la TRADD como la FADD se involucran en la activación de la SMasa ácida, este proceso parece pertenecer a la señalización que lleva a la inducción de la muerte celular (Adam-Klages, S. *et al.*, 1998).

La proteína FAN, un miembro de la familia que contiene repeticiones que finalizan en residuos de triptofano-ácido aspártico (repeticiones WD), se une directamente al TNFR-I. Dado que la región de unión en el receptor se requiere para la activación de la SMasa neutra y que la sobreexpresión de la FAN potencia la actividad de esta enzima que induce el $\text{TNF}\alpha$, se sugiere que la FAN regula la producción de la ceramida que induce el $\text{TNF}\alpha$ (Adam-Klages, S. *et al.*, 1996). A su vez, la FAN recluta por lo menos otra proteína con repeticiones WD, el receptor de la cinasa C activada (RACK1), cuya interacción con la FAN aumenta la actividad de la SMasa neutra (Tcherkasowa, A. E. *et al.*, 2002).

La importancia de la ceramida como un mensajero intracelular que es parte de una vía de señalización que culmina con la muerte celular se estableció principalmente por dos tipos de evidencia. Por un lado, análogos permeables de la ceramida tienen efecto citotóxico sobre las células sensibles al $\text{TNF}\alpha$ y este efecto es específico ya que análogos estructurales como la dihidroceramida o el diacilglicerol no mimetizan la acción del $\text{TNF}\alpha$ (Obeid, L. M. *et al.*, 1993). Aunado a estos hallazgos, la sobreexpresión de una enzima que participa en el metabolismo de la ceramida, la ceramidasa ácida, protege a las células L929 de la muerte que causa el $\text{TNF}\alpha$ (Strelow, A. *et al.*, 2000).

Algunos de los blancos directos de la ceramida incluyen una cinasa membranal, una fosfatasa y una $\text{PKC}\zeta$. Tanto el $\text{TNF}\alpha$ como las ceramidas

exógenas aumentan la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de la activación de una proteína cinasa dirigida por prolina que se localiza en la membrana (Joseph, C. K. *et al.*, 1993). La ceramida también activa, al parecer indirectamente, a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Raines, M. A. *et al.*, 1993). Diversos estudios *in vitro* revelaron que la ceramida activa una fosfatasa de residuos de serina y treonina de la subfamilia 2A, llamada proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP) (Dobrowsky, R. T. y Hannun, Y. A., 1992); La CAPP se inhibe por el ácido okadaico, y dado que concentraciones nanomolares de este inhibidor de fosfatasas 2A bloquean la muerte que induce la ceramida, parece existir una relación entre la activación de la CAPP y la inducción de la muerte. En cuanto a la activación de la PKC ζ por la ceramida, parece ser importante en mediar la regulación del NF- κ B en respuesta al TNF α (Lozano, J. *et al.*, 1994).

Dado que activadores de la PKC inhiben el efecto citotóxico de la ceramida, y que este lípido inhibe la generación del DAG a través de la vía de la fosfolipasa D (Venable, M. E. *et al.*, 1994), podría ser que los niveles celulares relativos de estos dos segundos mensajeros sean una clave determinante para la viabilidad celular. Cabe mencionar que el catabolismo de la ceramida lleva a la formación de bases esfingoides, como la esfingosina y la esfinganina, que a su vez pueden actuar como potentes inhibidores de las isoformas clásicas de la PKC (Gopee, N. V. y Sharma, R. P., 2003).

Proteínas G. Dado que los receptores del TNF α no tienen ninguna actividad catalítica, desde hace tiempo se pensó que algunas proteínas G podrían unir estos receptores a sistemas enzimáticos como la fosfolipasa C o la fosfolipasa A₂, que a su vez generan segundos mensajeros.

La evidencia experimental respecto al papel de las proteínas G en la transducción de la señal del $TNF\alpha$ es muy limitada hasta la fecha, y la mayoría de los datos se refieren a evidencias indirectas de su participación. En las células L929 el $TNF\alpha$ aumenta la unión del GTP a las proteínas de membrana, presumiblemente las proteínas G triméricas. Por datos de varios laboratorios, incluido el nuestro, se sabe que la citotoxicidad que induce el $TNF\alpha$ se inhibe por la toxina pertussis (Hepburn, A. *et al.*, 1987; Imamura, K. *et al.*, 1988). Esta sensibilidad sugiere la participación de subunidades alfa del tipo G_i o G_o , pero también es posible que la señalización del $TNF\alpha$ la medie un nuevo grupo de proteínas G sensibles a la toxina pertussis.

En las células HeLa y L929 que se tratan con el $TNF\alpha$, se observa una regulación negativa de los niveles de algunas de las proteínas que se asocian principalmente a los receptores $G(q)\alpha/G11\alpha$, pero no de $G(s)\alpha$, $G(i)\alpha$ y $G(o)\alpha$ (Pollock, V. P. *et al.*, 2000).

Se conoce que la proteína Ras está activa constitutivamente en algunas células sensibles al $TNF\alpha$ como las 10TEJ, o bien que el tratamiento con esta citocina aumenta la unión del GTP a las proteínas de membrana en las células L929, pero no en algunas células resistentes al $TNF\alpha$ como las 10T1/2. Por otro lado, la mutante dominante RasN17 bloquea la formación de Ras- GTP y la muerte celular que induce el $TNF\alpha$ (Trent, J. C. 2nd *et al.*, 1996).

Fosfolipasa A_2 . La fosfolipasa A_2 (PLA_2) se acopla a diferentes receptores de membrana por proteínas G , y después de su activación libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos. Varios inhibidores de PLA_2 reducen la citotoxicidad del $TNF\alpha$ en las células L929 y en la mayoría de las líneas tumorales que se estudiaron (Suffys, P. *et al.*, 1987). La cuestión de cómo la PLA_2 se involucra en la citotoxicidad no está resuelta; en estas mismas células,

inhibidores del metabolismo del araquidonato -como el ácido nordihidroguaiarético o la hidrocortisona-, disminuyen significativamente la citotoxicidad que induce el $\text{TNF}\alpha$ (Hepburn, A. *et al.*, 1987) pero paradójicamente no es posible identificar metabolitos de este ácido graso en las células que se tratan con la citocina.

En este proceso cabe mencionar a la MADD, un componente del complejo de señalización del TNFR-I, que participa en la vía de activación de las cinasas de la MAP y en la fosforilación de la fosfolipasa A_2 citosólica, lo que conduce a la liberación de ácido arquidónico.

Fosfolipasa C. En el caso de la PLC, las observaciones con inhibidores son consistentes con una vía de transducción que no media la muerte y sí quizá protección frente al $\text{TNF}\alpha$. Cabe resaltar que la activación de la PLC produce el diacilglicerol, que a su vez se contrapone a la acción inhibitoria de los productos del catabolismo de la ceramida (Webb, B. L. *et al.*, 2000).

Ca^{2+} . Uno de los efectos que se observan con mayor rapidez en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ es un aumento del Ca^{2+} intracelular, mismo que se relaciona con la activación de la PLC. En las células L929 se sugiere, por estudios con bloqueadores de canales catiónicos como el verapamil y el diltiazem, que este incremento del Ca^{2+} citoplásmico es un factor crucial en la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ (Kong, S. K. *et al.*, 1997). Es notable que, si se trata a estas células con el $\text{TNF}\alpha$ en la presencia de BAPTA/AM, un quelante del Ca^{2+} intracelular, disminuye la liberación de especies reactivas de oxígeno; si se disminuyen las especies reactivas por el 4-hidroxi 2,2,6,6-tetra-metil-piperidinoxil (4OH-TEMPO) se bloquea el aumento de Ca^{2+} que media el $\text{TNF}\alpha$. Estos resultados sugieren que las especies reactivas de oxígeno y el Ca^{2+} intracelular pudieran

ser dos mensajeros, importantes en la muerte que media el TNF α cuyas vías se entrecruzan (Ko, S. *et al.*, 2002).

Daño a DNA. Algunos grupos de investigación (Liddil, J. D. *et al.*, 1989) no encontraron relación entre la sensibilidad al TNF α y el daño al DNA, mientras que otros si notaron destrucción del DNA tanto en las células L929 como en otras líneas celulares (Zimmerman, R. J. *et al.*, 1989; Kosaka, T. *et al.*, 1992; Bellomo, G. *et al.*, 1992). Se proponen dos mecanismos para el daño al DNA, la destrucción que inducen los radicales libres y la activación de endonucleasas. La evidencia para esta última opción se basa en la inhibición de la citotoxicidad del TNF α por Zn²⁺, un conocido inhibidor de endonucleasas (Dealtry, G. B. *et al.*, 1987; Flieger, D. *et al.*, 1989). En particular para las células L929 se reportó que el tratamiento con el TNF α promueve un incremento en la cantidad de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina lo que sugiere daño oxidativo al DNA (Park, Y. M. *et al.*, 1998).

ADP ribosilación. La ADP ribosilación se relaciona a la acción citotóxica del TNF α en las células L929, aunque no se sabe si es una consecuencia de la fragmentación del DNA o si la poliADP ribosilación de proteínas en las células sensibles y no en resistentes (Agarwal, S. y Piesco, N.P., 1994) se involucra en la generación del proceso citotóxico (Agarwal, S. *et al.*, 1988). En las células L929, el TNF α induce la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) lo que contribuye a la depleción del ATP al utilizarse en la síntesis de recuperación del sustrato NAD⁺, lo que al parecer se relaciona a la subsiguiente necrosis (Los, M. *et al.*, 2002).

Estrés oxidativo. Entre los efectos del TNF α que correlacionan con citotoxicidad sobre sus células blanco, se reportó daño oxidativo que se manifiesta como peroxidación lipídica (Zimmerman, R. J. *et al.*, 1989),

producción de O_2^- (Matsubara, T. y Ziff, M., 1986) y H_2O_2 intracelularmente (Yamauchi, N. *et al.*, 1989) y en mitocondrias durante el transporte de e^- (Forman, H. J. y Boveris, A., 1982), y el daño mitocondrial (Schulze-Osthoff, K. *et al.*, 1992).

Por otro lado, las condiciones anaeróbicas y antioxidantes bloquean la citotoxicidad del $TNF\alpha$ (Matthews, N. *et al.*, 1987; Satomi, N. *et al.*, 1988) y el tratamiento con el $TNF\alpha$ induce la expresión del RNAm de la MnSOD (Wong, G. H. W. y Goeddel, D. F., 1988), de la metalotioneína (Shütze, S. *et al.*, 1988) y de la ferritina (Torti, S. V. *et al.*, 1988). De forma complementaria a estos estudios, la sobreexpresión de la MnSOD confiere un aumento en la resistencia al $TNF\alpha$ en varias líneas celulares (Wong, G. H. W. *et al.*, 1989).

En las células de leucemia resistentes a drogas, la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial por el $TNF\alpha$ es al menos parcialmente responsable de la citotoxicidad (Jia, L. *et al.*, 1996); en líneas celulares de carcinoma de ovario humano existe evidencia que involucra las especies reactivas de oxígeno mitocondriales en la muerte celular que media el $TNF\alpha$ (Uslu, R. y Bonavida, B., 1996).

En el modelo de citotoxicidad que induce el $TNF\alpha$ sobre fibroblastos NIH3T3 que se sensibilizan con cicloheximida, la muerte se relaciona con el estrés oxidativo que provoca la actividad de la NADPH oxidasa de membrana plasmática (Khwaja, A. y Tatton, L., 1999). En otros sistemas en los que ocurre la muerte celular por apoptosis como en los casos de neuronas a las que se priva del factor de crecimiento neural (NGF), se demostró que la NADPH oxidasa participa directamente en la generación de los radicales libres y la muerte (Tammariello, S. P. *et al.*, 2000).

En las células L929, se propone que las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en la cadena respiratoria son responsables de los efectos citotóxicos inducidos por esta citocina (Schulze-Osthoff, K. *et al.*, 1993). La disrupción de la integridad membranal por el $\text{TNF}\alpha$ es un punto de compromiso irreversible hacia la muerte celular en estas células (Grooten, J., *et al.*, 1993), que depende de la producción de ROS por la mitocondria (Goossens, V. *et al.*, 1995). Aunado a esto, el agrupamiento de las mitocondrias alrededor del núcleo (De Vos, K. *et al.*, 1998) correlaciona con la sensibilidad de las L929 al $\text{TNF}\alpha$.

ANTECEDENTES

Los reportes de estudios que utilizan las células L929 son contradictorios con respecto a su origen. Algunos refieren que se trata de una línea celular normal de fibroblastos pulmonares de embrión de ratón (Hehlgans, T. *et al.*, 2003). Por el contrario, otras publicaciones indican que las células L929 se derivan de un fibrosarcoma murino (Kalai, M. *et al.*, 2003; Miljkovic, D. *et al.*, 2002).

En realidad, esta línea celular se obtuvo a partir de tejido conectivo de un ratón de la cepa C3H de 100 días de edad (Earle, W. R., 1943). Posteriormente, a estas células en cultivo con fenotipo similar a fibroblastos se les añadió metilcolantreno durante 111 días. Este tratamiento modificó el fenotipo morfológico y transformó a estas células, originalmente normales, en las células capaces de inducir fibrosarcomas en ratones C3H. Años más tarde se aisló una célula que al multiplicarse originó la clona L929 (Sanford, K. K. *et al.*, 1948). En 1956 se comprobó la capacidad de estas células para generar tumores de forma similar a las células parentales L (Sanford, K. K. *et al.*, 1956).

Este resumen de la historia de la línea celular L929 tiene relevancia en la medida en que estas células se utilizan como modelo de fibroblastos "normales" o como modelo tumoral. Los resultados de cualquier experimento tienen implicaciones diferentes si se trata de un caso o del otro. Aunque resta por confirmar si la línea que manejamos en el laboratorio como L929 es capaz de generar tumores en ratones desnudos, en este trabajo interpretamos el comportamiento de las células L929 como prototipo de las células tumorales. Estudios que realizó en nuestro laboratorio el Biól. José Luis Ventura indican que la clona L929 que utilizamos es capaz de crecer en agar, lo que se maneja como característico de las células transformadas.

Las células L929 se encuentran entre las primeras líneas celulares que se identificaron como sensibles a la actividad citotóxica del TNF α (Flick, D. A. y Gifford, G. E., 1984). Estas células de ratón se utilizaron, junto con las células WEHI, en bioensayos de detección para la purificación inicial del TNF α debido a su alta sensibilidad a este factor. Aún hoy en día estas células se emplean para valorar la presencia del TNF α en muestras de fluidos biológicos o en medios condicionados de cultivos *in vitro* (Evans, T. J., 2000; Estrada, A. *et al.*, 2003).

En la tabla 3 se resumen los datos obtenidos a la fecha en relación con el efecto citotóxico del TNF α sobre las células L929.

Tabla 3. Resumen de referencias más relevantes que se relacionan con el efecto del TNF α sobre las células L929.

Sensibilidad al efecto citotóxico del TNF α	Flick, D. A. y Gifford, G. E., 1984
Reducción por inhibidores de la PLA ₂ de la citotoxicidad que causa el TNF α	Suffys, P. <i>et al.</i> , 1987
Inhibición de la toxicidad que causa el TNF α por toxina pertussis	Hepburn, A. <i>et al.</i> , 1987; Imamura, K. <i>et al.</i> , 1988)
La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causa el TNF α se relacionan con el efecto citotóxico	Schulze-Osthoff, K. <i>et al.</i> , 1993
Disrupción de la integridad membranal por el TNF α dependiente de la producción de EORs por la mitocondria	Goosens, V. <i>et al.</i> , 1995
El TNF α causa un incremento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	Park, Y. M. <i>et al.</i> , 1998
Agrupamiento de las mitocondrias alrededor del núcleo que correlaciona con la sensibilidad al TNF α	De Vos, K. <i>et al.</i> , 1998
Protección del efecto citotóxico del TNF α por sobreexpresión de ceramidasa ácida	Strelow, A. <i>et al.</i> , 2000
Activación de PARP-1 que causa el TNF α	Los, M. <i>et al.</i> , 2002

OBJETIVO

Dado que existe gran cantidad de información previa (tabla 3) respecto al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ y su posible relación con el estrés oxidativo en las células L929, esta tesis doctoral tiene como

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el papel que el estrés oxidativo juega en la citotoxicidad que causa el $\text{TNF}\alpha$ sobre las células L929.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Caracterizar el tipo de estrés oxidativo que se genera por el $\text{TNF}\alpha$ sobre estas células.
- Establecer si existe una relación entre la presencia de especies reactivas de oxígeno y la muerte.
- Definir el curso temporal de aparición de los radicales libres dependiente del $\text{TNF}\alpha$.
- Explorar la inducibilidad del estrés oxidativo y su correlación con fases específicas del ciclo celular.
- Proponer un modelo del mecanismo de la muerte que causa el $\text{TNF}\alpha$ sobre los fibroblastos L929 que integre los datos previos que se reportaron en la literatura y las aportaciones de este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular. La línea celular L929 (In Vitro, S. A., México, México) se creció regularmente a 37°C y 5% de CO₂ en MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY) inactivado. El TNF α (R & D Systems, Minneapolis, MN) se utilizó a 5 ng/ml a menos que se indique otra concentración y durante los tiempos indicados en cada experimento. Cuando se utilizó actinomicina-D (Sigma, St. Louis, MO) (1 μ g/ml), el TNF α se utilizó a 0.01 ng/ml. Se utilizaron frascos de cultivo 25 y 75 cm² (Corning, Corning, NY) para mantener los acarreadores celulares y cajas de 16, 24, 48 y 96 (Corning, Corning, NY) pozos para los diferentes experimentos.

Clonación por dilución limitada. Después del conteo, las células L929 se diluyeron para que hubiera aproximadamente 50 células en 2 ml de medio. Posteriormente se sembraron en placas de 96 (200 μ l/pozo) de tal forma que hubiera una célula por cada dos pozos y la posibilidad de que se obtuvieran dos colonias en el mismo pozo fuera mínima. Las colonias individuales que crecieron normalmente se resembraron por triplicado para probar su sensibilidad a TNF α (5 ng/ml) y a puromicina (3 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO); se seleccionó la L929-P6 para el trabajo posterior por su sensibilidad a TNF α y al antibiótico puromicina.

Resiembra para experimento. A menos que se dé otra indicación, para realizar los experimentos las células se crecieron hasta 50-80% de confluencia, se desprendieron del plato con tripsina 0.1 % (Sigma, St. Louis, MO) y se contaron

con ayuda de una cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania). Generalmente se sembraron a 20, 000 células por cm^2 y 24 h después se comenzó el experimento.

Reducción de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT) . El MTT (Sigma, St. Louis, MO) se añadió a los cultivos 4 h antes del término de cada experimento a una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$. Después de este lapso de tiempo, el medio se aspiró y las sales de formazán se solubilizaron con 250 μl (en pozos de 1 cm^2) de isopropanol (Sigma, St. Louis, MO) ácido (0.1 N HCl en isopropanol). Después de 10 min se adicionaron 250 μl de amortiguador de fosfatos (PBS) (J. T. Baker, Xalostoc, México), este material se sometió a un análisis espectrofotométrico a 570 y 630 nm y la diferencia entre las dos densidades ópticas obtenidas ($\text{DO}_{570 \text{ nm}} - \text{DO}_{630 \text{ nm}}$) se tomó como un valor directamente proporcional a la reducción del MTT. El PBS se preparó con 8 g de NaCl (J. T. Baker, Xalostoc, México), 0.2 g de KCl (J. T. Baker, Xalostoc, México), 2.16 g de Na_2HPO_4 (J. T. Baker, Xalostoc, México) y 0.2 g de KH_2PO_4 (J. T. Baker, Xalostoc, México) para 1 litro.

Conteo celular por exclusión de azul de tripano. Se aspiró el medio de cultivo, se añadieron 100 ml de tripsina 0.1% (pozos de 1 cm^2). Al desprenderse el 100% de las células se añadieron 100 ml de azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO), se mezcló con micropipeta varias veces y se contó en la cámara de Neubauer. Para los experimentos de viabilidad se contaron 10 campos para cada pozo. Se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar a partir de los duplicados o triplicados.

Cálculo del índice de estrés oxidativo y desviación estándar. Cada valor de MTT (sin promediar) se dividió entre cada valor obtenido del conteo por exclusión de azul de tripano (sin promediar). Cada uno de los cocientes obtenidos para los puntos experimentales se dividió entre cada uno de los cocientes obtenidos para el control. Estos nuevos cocientes se promediaron y se obtuvo su desviación estándar. Este valor se empleó como un índice del estrés oxidativo en las células presentes en el pozo al momento de analizar la reducción de MTT y la viabilidad por exclusión de azul de tripano.

Adición de antioxidantes. El DTT y el DTE (Sigma, St. Louis, MO) se ensayaron en curvas de concentración de 0.25 mM a 4 mM. El fenol (Sigma, St. Louis, MO) se probó en concentraciones desde 0.015% hasta 0.06%. El DMSO (Sigma, St. Louis, MO) se ensayó en curvas de concentración entre 0.5% y 2%. El 2-mercapto etanol (2-ME) (Sigma, St. Louis, MO) se probó en concentraciones de 4 μ M hasta 1 mM. La L-tirosina (Sigma, St. Louis, MO) se ensayó desde 0.062 mM hasta 1 mM.

Tinción con cristal violeta. Al término de los experimentos se aspiró el medio de cultivo y se fijaron las células con glutaraldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) al 1.1 % en medio de cultivo suplementado con 1% de suero de ternera, durante 20 min a temperatura ambiente. Se aspiró el glutaraldehído y se adicionó el cristal violeta al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania) 200 mM, pH 6.0. Después de mantener 15 min en agitación se eliminó el cristal violeta y se lavó exhaustivamente con agua corriente. Se dejó secar, se redisolvió en 100 μ l (pozos de 0.3 cm²) de

ácido acético (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 10% y posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a 590 nm.

Purificación de plásmidos. Todos los plásmidos utilizados en las transfecciones se purificaron con el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA) y se desalaron con columnas Elutip-D (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Se utilizaron enzimas y otros reactivos para las restricciones (Gibco BRL, Grand Island, NY). Los ácidos nucleicos se visualizaron con luz ultravioleta luego de una electroforesis en geles de agarosa (Gibco, Grand Island, NY) teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO).

Transfección con lipofectamina (Gibco BRL, Grand Island, NY). Se sembraron 20, 000 células/cm² (L929) con 24 h de anterioridad a la transfección. Después de aspirar el medio, a cada pozo (2 cm²) se le añadió un volumen de 0.5 ml que incluyó MEM sin suero, 12.5 µl de Lipofectamina y 2 µg de los plásmidos pBabePuroBcl-2 (Fanidi, A. et al., 1992) (donado amablemente por el Dr. Luis Covarrubias, IBT) y pBabePuro (obtenido a partir del anterior por eliminación del inserto clonado en el sitio de restricción de la enzima EcoR1). Se realizó una incubación de 45 min al término de la cual se adicionó 1 ml de MEM con suero fetal bovino inactivado al 10%. Se les cambió el medio 24 h después y 72 h después de la transfección se resembraron las células sobrevivientes y se comenzó la selección con la concentración recomendada de puromicina, es decir 3 µg/ml. Dado que la gran mayoría no parecía ser sensible a esta concentración, se adicionó puromicina hasta 8 µg/ml, concentración a la cual todas las células control (sin transfectar) murieron. Las células transfectadas que sobrevivieron a esta selección se resembraron, recuperadas

como clonas con aros de vidrio y expandidas siempre con el antibiótico de selección.

Transfección por precipitación con fosfato de calcio (estuche de Gibco BRL, Grand Island, NY). Se sembraron 20, 000 células/cm² (L929-P6) con 24 h de anterioridad a la transfección. 4 h antes del procedimiento se retiró el medio y se adicionaron 0.9 ml de MEM con 10% de suero en cada pozo (9 cm²). Para cada transfección distinta se etiquetaron dos tubos (tubos 1 y 2). A los tubos 1 se les añadió 0.1 ml del amortiguador HBS 1X y 2 µl de la solución de fosfato; a los tubos 2 se le añadió un volumen de 86 µl que incluyó agua, 10 µg de DNA acarreador y 10 µg de los plásmidos de interés, a estos mismos tubos se les añadieron 2 µl de la solución de calcio, se mezcló y se añadieron ahora 10 µl de la misma solución de calcio. Mientras se burbujeó cada tubo 1, se añadió el contenido del correspondiente tubo 2 gota a gota. Se mantuvo 20 min a temperatura ambiente, se mezcló bien y se añadió lentamente a cada pozo. 24 h después se les cambió el medio y 72 h después de la transfección se resembraron para comenzar la selección con puromicina (3 µg/ml). Las células transfectadas que sobrevivieron a esta selección se resembraron, recuperadas como clonas con aros de vidrio y expandidas siempre con el antibiótico de selección.

Tratamiento con H₂O₂ (Sigma, St. Louis, MO). Las células se trataron durante 4 h con concentraciones entre 2 y 8 mM de H₂O₂.

Tratamiento con ceramidas sintéticas. Las células se incubaron durante 15 ó 18 h con 20 µM de ceramida C-6 o 25 µM de ceramida C-8 (Biomol, Plymouth

Meeting, PA). La ceramida C-6 se utilizó en una razón molar 1:1 con albúmina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO) y la ceramida C-8 se utilizó a partir de un concentrado 100X en etanol (Sigma, St. Louis, MO).

Detección de especies reactivas de oxígeno por 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) (Molecular Probes, Eugene, OR). Al finalizar los tratamientos se tripsinizaron las células, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm y se resuspendieron en 1 ml de PBS que contenía DCF a una concentración de 4 μ M. Después de una incubación de 15 min en la oscuridad, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm y se resuspendieron en 1 ml de PBS. La lectura en el citómetro se realizó dentro de los siguientes 30 min.

Análisis de ciclo celular por citometría de flujo. Al finalizar los tratamientos las células se tripsinizaron, se centrifugaron, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar. Posteriormente se resuspendieron en 500 μ l de metanol (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 95% en PBS, se incubaron 15 min en hielo y se volvieron a centrifugar. Se resuspendieron ahora en 1 ml de PBS que contenía RNasa (Gibco BRL, Grand Island, NY) a una actividad final de 5 U/ml y se incubaron 30 min a 37°C. Al término de la incubación se adicionó yoduro de propidio (a una concentración final de 50 μ g/ml).

Sincronización en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. Las células L929-P6 se crecieron hasta confluencia, se aspiró el medio y se adicionó medio sin suero durante 24 h más. En ese momento (tiempo 0) las células se tripsinizaron y se sembraron para los experimentos.

Actividad de lactato deshidrogenasa. Al término de los experimentos, se recolectaron 40 μ l del medio de cultivo (muestra experimental) en un microtubotubo de 0.5 ml (Axygen, Union City, CA) y se almacenaron a 4°C, al medio restante se le añadieron 4.65 μ l de Tritón al 10% (Sigma, St. Louis, MO) por cada 500 μ l de medio, se incubó de 5 a 10 min y se recolectaron otros 40 μ l (empleados para la determinación de la lactato deshidrogenasa total). Se adicionaron a la cubeta de cuarzo (Sigma, St. Louis, MO) 833 μ l de NADH (Sigma, St. Louis, MO) 0.244 mM en un amortiguador de Tris (81.3 mM) (Sigma, St. Louis, MO) y NaCl (203.3 mM) pH 7.2, y se leyeron en el espectrofotómetro a 340 nm durante 2 min en intervalos de 15 seg. Después se añadieron 16.7 μ l de muestra, se mezclaron y se volvió a leer en el espectrofotómetro en las mismas condiciones. Por último, se añadieron 170 μ l de piruvato (Sigma, St. Louis, MO) 9.76 mM en el mismo buffer de Tris y NaCl y se repitió la lectura bajo las condiciones arriba indicadas.

De cada lectura de 2 min se calculó el cambio promedio. Se restó el cambio promedio con muestra sin piruvato del cambio promedio en presencia de piruvato. Este cambio promedio normalizado se convirtió en porcentaje considerando el cambio promedio normalizado de la lactato deshidrogenasa total como 100%.

Incorporación de [³H]-timidina (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). La [³H]-timidina (1 μ Ci/ml) se añadió a los cultivos 4 h antes del tiempo final del experimento. Transcurridas las 4 h se aspiró el medio, se lavaron las células 2 veces con PBS y se fijaron durante 15 min con metanol al 95% en PBS. Las células se lisaron durante toda la noche con NaOH (J. T. Baker, Xalostoc, México) 0.2 N, al día siguiente se colectó el lisado, se mezcló con 3 ml de

tritrosol y se leyó durante 1 min en el contador de centelleo. El tritrosol contenía 7 g de PPO (Sigma, St. Louis, MO), 0.5 g de POPOP (Sigma, St. Louis, MO), 650 ml de tolueno (J. T. Baker, Xalostoc, México) y 350 ml de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO) por cada litro.

Preparación de extractos celulares de proteína total. Se lavaron las células dos veces con PBS a 4°C y se aspiró totalmente el amortiguador. Se añadieron 350 µl (para placa de 100 mm) de amortiguador de lisis (Tris 25 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, NP-40 2%, SDS 0.2%, PMSF 1 mM, aprotinina 50 µg/ml y leupeptina 50 µM) (Sigma, St. Louis, MO) y incubó 20 min a 4°C. Se recolectó el lisado y se centrifugó 15 min a 14 k rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se estimó la concentración por el método de Bradford (Biorad, Hercules, CA).

Electroforesis de proteína en geles desnaturalizantes. El gel concentrador se preparó con 1.67 ml de la solución concentrada de acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8% (Sigma, St. Louis, MO), 2.5 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 5.7 ml de H₂O, 100 µl de SDS 10%, 10 ml de TEMED (Biorad, Hercules, CA) y 100 µl de persulfato de amonio (Sigma, St. Louis, MO) al 10%. El gel separador al 12% se preparó con 15.2 ml de la solución concentrada de acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8%, 9.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 12.9 ml de H₂O, 380 µl de SDS 10%, 15 µl de TEMED y 150 µl de persulfato de amonio al 10%. El gel sellador se preparó con 1.65 de la solución concentrada de acrilamida:bis-acrilamida, 1.31 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 1.98 ml de H₂O, 10 µl de TEMED y 60 µl de persulfato de amonio al 10%. El amortiguador de corrida se preparó con 12.13 g de Tris, 57.05 g de glicina, 4 g de SDS y H₂O hasta 4 l. Se utilizó el amortiguador de muestra Laemmli que se preparó con 0.3 g de Tris, 0.96 g de SDS, 2 ml de 2-

mercaptoetanol, 4 ml de glicerol, 0.04 g de azul de bromofenol (Sigma, St. Louis, MO) y H₂O hasta 100 ml. Las muestras (150 µg de proteína, amortiguador de muestra 4X y H₂O hasta 150 µl) se hirvieron durante 5 min antes de cargar en el gel.

Detección de proteína por inmunoblot. Al término de la electroforesis, el gel se transfirió entre dos pares de papeles filtro a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 3 h a 400 mA. El amortiguador de transferencia se preparó con 3.03 g de Tris, 14.4 g de glicina, 200 ml de metanol y H₂O hasta 1 l. Después de la transferencia la membrana se tiñó con solución de Ponceau (Sigma, St. Louis, MO) para corroborar que la transferencia hubiera ocurrido de forma homogénea en toda la superficie y que el cargado de los diferentes pozos hubiera sido homogéneo. La membrana se enjuagó y se bloqueó con leche libre de grasa al 6% en TBS/Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua. Se enjuagó la solución bloqueadora con TBS/Tween 0.1% y se incubó el anticuerpo primario antiBcl-2 (Boehringer, Ingelheim, Alemania) (a una dilución 1:80 en 5 ml de una solución TBS/Tween 0.1%/BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua. Se hicieron tres lavados de 5 min con TBS/Tween 0.1% y se incubó el anticuerpo secundario biotinilado (Dako, Glostrup, Dinamarca) (a una dilución 1:2500 en TBS/Tween 0.1%/BSA 1%) durante 30 min a temperatura ambiente con agitación continua. De nuevo se hicieron tres lavados de 5 min con TBS/Tween 0.1%, se agregó la mezcla de avidina y biotina-peroxidasa (Dako, Glostrup, Dinamarca) (50 µl de avidina, 50 µl de biotina-peroxidasa en 5 ml de Tris 50 mM pH 7.6) y se incubó en la oscuridad. Se hicieron tres lavados de 5 min, se añadieron 5 ml de la mezcla de

luminol (Dako, Glostrup, Dinamarca), se incubó 1 min en la oscuridad, se expuso una placa de autoradiografía (Kodak, Rochester, NY) durante 30 seg y se reveló y fijó con las soluciones recomendadas (Kodak, Rochester, NY).

Extracción de RNA total. Las células se tripsinizaron (caja de 100 mm) y después de centrifugarse se lisaron por pipeteo con 1 ml de Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY). El lisado se incubó 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente con la mano y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 g durante 15 min a 4°C, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12 000 g 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75% en H₂O tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO). Se mezcló con vórtex y luego se centrifugó a 2 500 g durante 5 min a 4°C. Se secó el pellet al aire durante 10 min y se disolvió en 20 ml de H₂O tratada con DEPC. Se incubó durante 10 min a 55°C y luego se congeló a -20°C.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa. Para la transcripción reversa se preparó una mezcla que contenía los siguientes reactivos del estuche de RT-PCR de Perkin Elmer (Boston, MA): MgCl₂ (4 µl por reacción), amortiguador de reacción 10X (2 µl por reacción), H₂O estéril (1 µl por reacción), dGTP, dATP, dTTP y dCTP (2 µl de cada uno por reacción), inhibidor de RNasa (1 µl por reacción) y transcriptasa reversa (1 µl por reacción). Los 17 µl correspondientes se adicionaron a cada tubo además de 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (15 µM) (oligo dT o hexámeros al azar) y 2 µl de RNA a la concentración recomendada. Se añadieron 50 µl de aceite

mineral y se incubaron en el ciclador térmico 15 min a 42°C, 5 min a 99°C y 5 min a 5°C. A continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa y para ésta se preparó una mezcla que contenía los siguientes reactivos del estuche mencionado: MgCl₂ (4 µl por reacción), amortiguador de reacción 10X (4 µl por reacción), H₂O estéril (65.5 µl por reacción) y la polimerasa Taq (0.5 µl por reacción). Los 78 µl correspondientes se adicionaron a cada tubo en los que se había realizado la transcripción reversa además de 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos empleados como cebadores (15 µM). Se incubaron en el ciclador térmico 10 min a 95°C, luego 20 ciclos que comprendían 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, al finalizar los ciclos 10 min a 72°C e indefinidamente a 4°C.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores fue:

Bcl-2 (fragmento cDNA 400 pb)

5' GAC TTC GCC GAG ATG TCC AG 3' Oligonucleótido sentido

5' GGC CAC AAG TGA AGT CAA CA 3' Oligonucleótido antisentido

Bcl-x_L (fragmento cDNA 800 pb)

5' TTG GAC AAT GGA CTG GTT GA 3' Oligonucleótido sentido

5' GTA GAG TGG ATG GTC AGT G 3' Oligonucleótido antisentido

Bax (fragmento cDNA 300 pb)

5' GAA CAG ATC ATG AAG ACA GG 3' Oligonucleótido sentido

5' GCA AAG TAG AAG AGG GCA AC 3' Oligonucleótido antisentido

RESULTADOS y DISCUSIÓN

El TNF α causa un estrés oxidativo detectable por reducción del MTT

Los estudios realizados con el fin de caracterizar la muerte celular que induce el TNF α coinciden en señalar al estrés oxidativo como un fenómeno que acompaña a la misma (Meier, B. *et al.*, 1989; Das, U. N. *et al.*, 1990; Kretz-Remy, C. *et al.*, 1996). Sin embargo, poco se conoce acerca de su naturaleza o de su comportamiento en el tiempo.

Para determinar si el TNF α genera un estrés oxidativo en los fibroblastos de ratón L929, se realizaron experimentos en la clona L929-P6 con el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT). El MTT es una molécula que puede aceptar electrones de alto potencial redox, como los provenientes de las deshidrogenasas mitocondriales (Slater, T. F. *et al.*, 1963) o del radical superóxido (O_2^-) (Burdon, R. H. *et al.*, 1990). La reducción de esta sal de tetrazolio produce formazán que se utiliza comúnmente como una medida de actividad respiratoria -y consecuentemente de viabilidad celular- (Denizot, F. y Lang, R., 1986; Carmichael, J. *et al.*, 1987; Vistica, D. *et al.*, 1991), ya que el anillo de tetrazolio se rompe por acción de las deshidrogenasas de mitocondrias activas (Mosmann, T., 1983) y admite los electrones provenientes del O_2^- que se produce colateralmente en la transferencia mitocondrial de electrones (Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C., 1989; Gardner, J. F. y Boveris, A., 1990). El formazán que se produce precipita y forma cristales de tal forma que ya no es soluble en el medio. Con la posterior solubilización de los cristales con isopropanol ácido es posible

cuantificar la cantidad del MTT que se reduce e indirectamente la actividad respiratoria de las células.

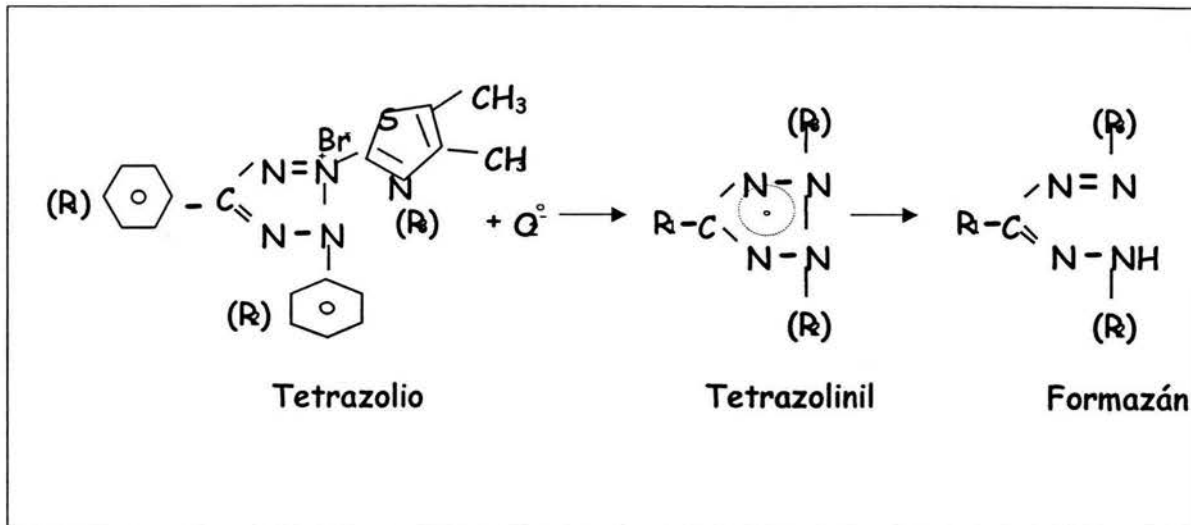


Figura 8. Reducción del MTT por acción del radical superóxido.

En estos primeros experimentos (la figura 9 muestra uno representativo) se comparó la reducción del MTT de las células que se trataron con el $TNF\alpha$ y de sus controles sin tratar, así como los cambios que se observan después de distintos periodos de tratamiento.

Con una exposición de 12 h al $TNF\alpha$, no se observó ninguna diferencia entre controles y las células con tratamiento. A las 24 h el valor de absorbencia que corresponde a la reducción del MTT es similar ya sea que las células estén o no en presencia del $TNF\alpha$ (figura 9B); sin embargo, dado que el número celular es claramente menor en los pozos que se trataron con la citocina (figura 9A), los fibroblastos L929-P6 en presencia del $TNF\alpha$ reducen más el MTT que sus controles. Esto significa que el $TNF\alpha$ causa un estrés oxidativo, que presumiblemente ocasionan las especies reactivas con

electrones de alto potencial de óxido-reducción, que se manifiesta a las 24 h de contacto con las células.

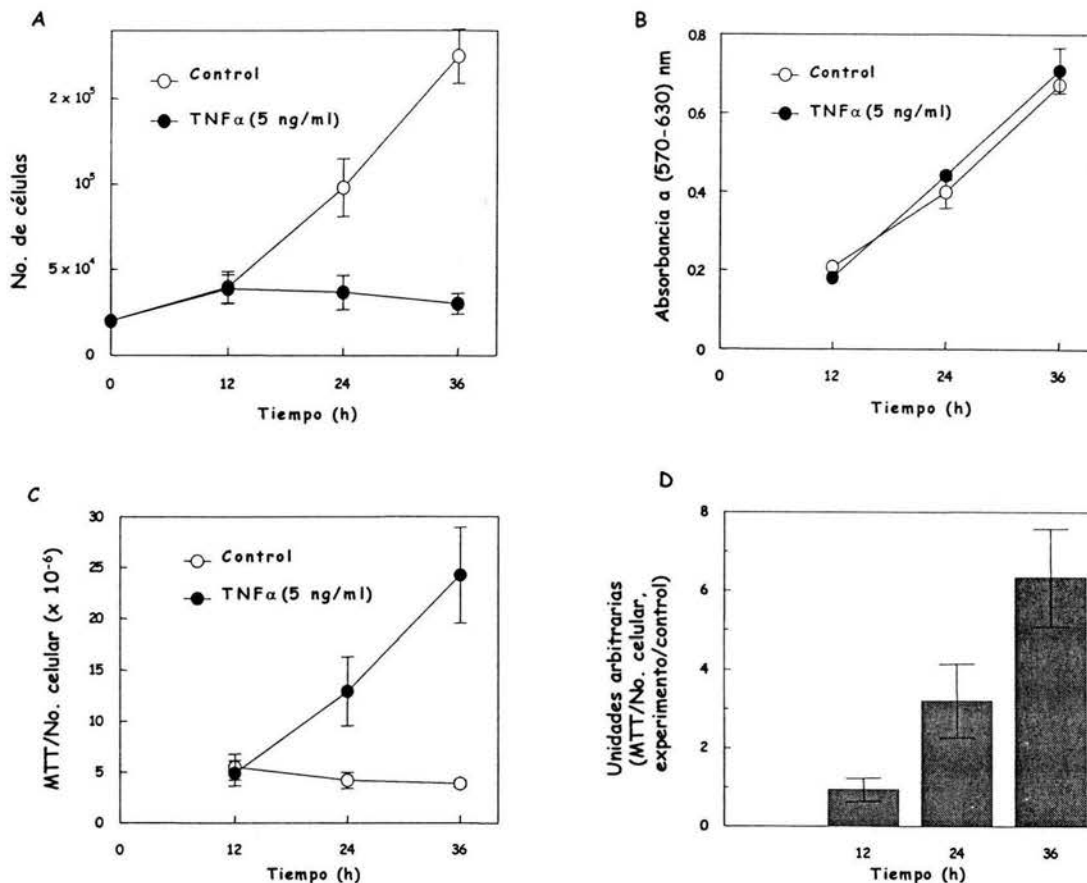


Figura 9. Reducción del MTT en las células L929-P6 que se trataron con el TNF α . Se sembraron 20 000 células por pozo (t=0) e inmediatamente se añadió el TNF α los pozos con tratamiento. A las 12, 24 y 36 h se contaron las células (por duplicado) y se cuantificó la reducción del MTT (por duplicado) en pozos paralelos. (A) No. de células que se cuantificó por exclusión de azul tripano en cultivos control y en presencia del TNF α . (B) Reducción del MTT en las células control y con tratamiento. El MTT (200 μ g/ml) se adicionó 4 h antes de los tiempos que se indican y se dejó en el cultivo hasta el momento del conteo celular (ver materiales y métodos). (C) Gráfica que muestra el MTT que se redujo por célula en cultivos control y con tratamiento. (D) Número de veces que aumenta la reducción del MTT por célula de los cultivos que se trataron con el TNF α respecto a sus controles (índice de estrés oxidativo).

Para hacer claramente visible este efecto, se dividió la reducción del MTT (valor de absorbencia) entre el número de células; al graficar los resultados (figura 9C), se observa que las células control tienen una reducción por número de célula constante a lo largo del experimento, mientras que en presencia del $\text{TNF}\alpha$, la reducción aumenta en el tiempo.

Para obtener un valor que indique cuántas veces es mayor la reducción con respecto a los controles, se dividieron ahora los valores de la gráfica C para las células con tratamiento, entre los valores de las células control. En adelante esta relación se referirá como índice de estrés oxidativo.

La gráfica D de la figura 9 muestra los valores del índice de estrés oxidativo que se obtuvieron en este experimento. Mientras a las 12 h el cociente es cercano a 1, lo que indica que la reducción es similar en presencia o no del $\text{TNF}\alpha$, a las 24 y 36 h se obtienen índices de estrés oxidativo alrededor de 3 y 6 respectivamente. Estos valores correlacionan con una disminución del porcentaje de las células vivas respecto al control para cada tiempo (96, 37 y 17%, a las 12, 24 y 36 h).

Este experimento se repitió varias veces, la tabla 3 muestra los resultados de tres de ellos, incluido el que se discutió anteriormente. El promedio de los índices de estrés oxidativo de los tres se muestra gráficamente en la figura 10.

Falta página

N° 66

		No. de células (A) ($\times 10^3$)	Abs (570-630) nm (B)	B/A (C) ($\times 10^{-6}$)	$C_{TNF}/$ $C_{control}$
12 h	Control	39.5±9.1 ⁽¹⁾	0.2076±0.0043	5.49±1.3	0.93±0.3
		34±26.46 ⁽²⁾	0.4355±0.0036	18.64±10.88	1.53±1.07
		29±1.4 ⁽³⁾	0.2825	9.75±0.5	0.92±0.05
	+ TNF	38.5±8.4	0.1799±0.0041	4.89±1.3	
		23±7.07	0.4289±0.0341	19.5±5.08	
		32.2±1.4	0.2869±0.0051	8.92±0.3	
24 h	Control	98±17.0	0.3998±0.0421	4.18±0.8	3.2±0.94
		101±21.21	0.7114±0.0231	7.2±1.25	2.1±1.03
		50±2.1	0.3739±0.0150	7.49±0.4	1.49±0.32
	+ TNF	36.5±10.0	0.4410±0.0113	12.91±3.4	
		35±4.24	0.6251±0.0313	17.99±1.93	
		28.6±8.2	0.3053±0.0156	11.13±2.7	
36 h	Control	175±15.9	0.6715	3.86±0.3	6.33±1.25
		137.5±38.6	0.7975±0.0502	6.17±1.7	3.04±1.2
		95.2±11.9	0.9975±0.0196	10.56±1.1	5.01±1
	+ TNF	30±6.0	0.7086±0.0579	24.27±4.7	
		34±10.7	0.5548±0.0966	17.6±5.6	
		12±2.3	0.6370±0.0258	52.5±10.3	

Tabla 3. Reducción del MTT en las células L929-P6 que se trataron con el TNF α . Resumen de tres experimentos independientes (1, 2 y 3). Se muestran los promedios \pm desviación estándar.

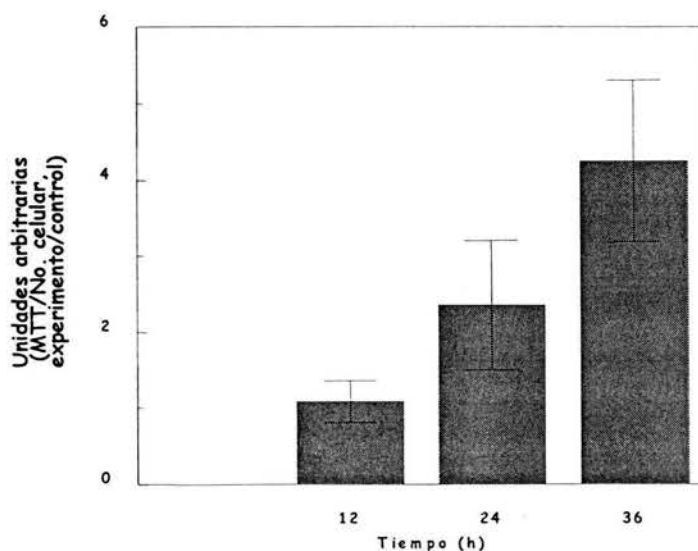


Figura 10. Índice de estrés oxidativo. Promedio de los valores que se obtuvieron en los experimentos de la tabla 3. Se indica la desviación estándar.

El índice de estrés oxidativo que induce el $\text{TNF}\alpha$ correlaciona con la muerte en las células L929-P6

Con el fin de dilucidar si existe una dosis umbral de las especies reactivas de oxígeno que se asocia a la muerte, se analizaron los índices de estrés oxidativo de las células en presencia de concentraciones del $\text{TNF}\alpha$ por debajo de la que utilizamos comúnmente (5 ng/ml). Para esto se realizaron experimentos desde 24 h en presencia del factor, tiempo en el cual ya es posible ver un aumento en la reducción del MTT. En la figura 11A se presentan los índices que se obtuvieron de dos experimentos independientes; por un lado se observa que prácticamente no hay efecto diferencial entre las diferentes dosis y por otro, aún con la menor concentración (0.078 ng/ml) hay diferencias con respecto al control. A las 24 h en presencia del $\text{TNF}\alpha$, el índice de estrés oxidativo tiene valores, en general, entre 1 y 2 en todas las concentraciones que se utilizaron. Esto coincide con un número celular que oscila alrededor del 50% con respecto al control, que al ser igual al número de las células que se sembraron originalmente refleja muy probablemente un bloqueo de la proliferación celular.

Si el $\text{TNF}\alpha$ permanece 36 h con las células el efecto de la dosis ya es evidente (figura 11B). Cuando se comparan con los índices que se obtuvieron en los experimentos de 24 h, para todas las concentraciones hay un aumento en el índice de estrés oxidativo. En este caso todos los valores están por arriba de 2 y coinciden con un número celular inferior a 50% respecto a las L929-P6 que no recibieron tratamiento.

Dado que la duración del ciclo celular en estos fibroblastos es cercano a las 24 h, un número celular de 50% o más a partir de las 24 h -si se considera que en este lapso todas las células ya se dividieron-, puede indicar que, o bien

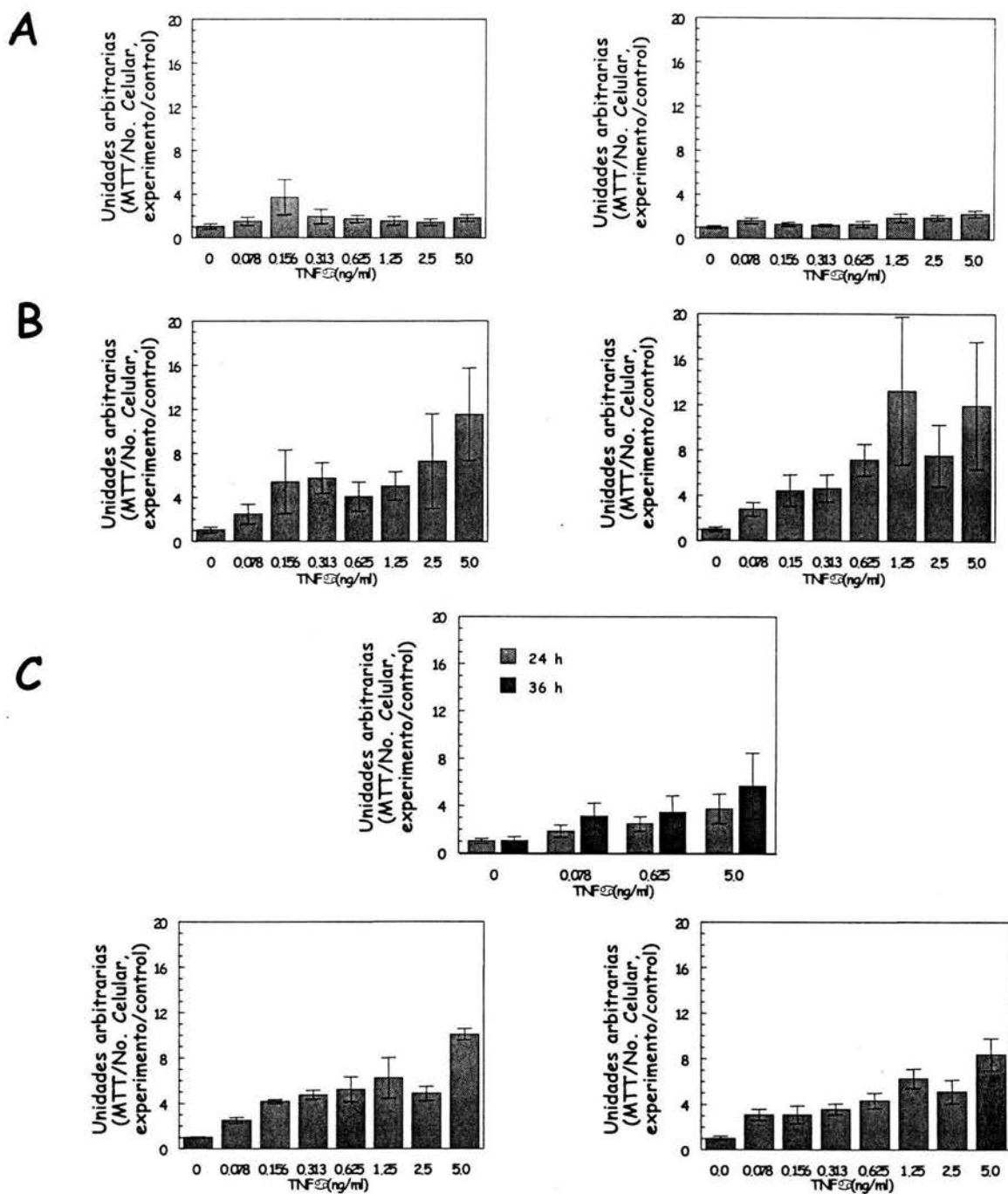


Figura 11. Índice de estrés oxidativo dependiente de dosis. (A) Experimentos independientes en los que el TNF α se adicionó durante 24 h a las concentraciones que se indican. (B) Experimentos independientes en los que el TNF α se adicionó durante 36 h a las concentraciones que se indican. (C) Experimento en que se adicionó el TNF α durante 24 y 36 h a las concentraciones que se indican. (D) Experimentos independientes en los que el TNF α se adicionó por 48 h a las concentraciones que se indican.

existe un equilibrio entre la división celular y la muerte, o bien las células no se dividieron, o una mezcla de ambos fenómenos. Si el porcentaje es inferior a 50%, esto significa que hay menos células de las que se sembraron, y por lo tanto ocurrió la muerte celular.

La existencia de un estrés a las 24 h y el aumento del mismo que se observa a las 36 h indican que se trata de un fenómeno gradual, es decir que las células con un valor alto tuvieron antes valores menores.

Para corroborar esto se realizó un experimento en el que se calcularon los índices a las 24 y 36 h. Aunque se observan diferencias con respecto a los valores promedio de los experimentos anteriores, es obvio un aumento gradual para las tres condiciones que se estudiaron (figura 11C).

Cuando las células se mantienen en contacto con el $\text{TNF}\alpha$ durante 48 h se observa un comportamiento similar que al de las 36 h (figura 11D). Sin embargo, algo a destacar es que las desviaciones estándar son más pequeñas; una posible explicación es que en el experimento de 36 h se tenga una población mixta de las células que se encuentran en distintas fases del proceso de la muerte, es decir, las células que recién entraron en el proceso (similares a algunas de 24 h) y las células que se encuentran en fases más avanzadas o a punto de morir (como pudieran ser las de 48 h).

Con el propósito de visualizar si puede haber incremento del estrés oxidativo sin disminución del número celular o viceversa, se graficó el índice de estrés oxidativo contra el porcentaje del número celular (figura 12). Lo primero que se observó es la ya mencionada correlación entre índice menor o igual a 2 y 50% o más de número celular, e índice superior a 2 con un número celular menor de 50%, en todos los tiempos y concentraciones. Aunado a esto se detectaron dos componentes en las curvas; el primero con una pendiente

muy acusada, que se origina por la clara diferencia en el número celular respecto al control sin tratar y el poco aumento en estrés y la segunda, que es asintótica con respecto al eje de las abscisas, y se origina por una diferencia menor entre el número celular cuantificado para cada dosis y el claro aumento de índice estrés oxidativo entre esas dosis.

Como ya se mencionó anteriormente, con el conteo celular no es posible distinguir si las células murieron o no progresaron en el ciclo celular. En cualquier caso, la falta de duplicación celular en presencia del $\text{TNF}\alpha$ puede explicar la gran pendiente de la primera parte de la curva.

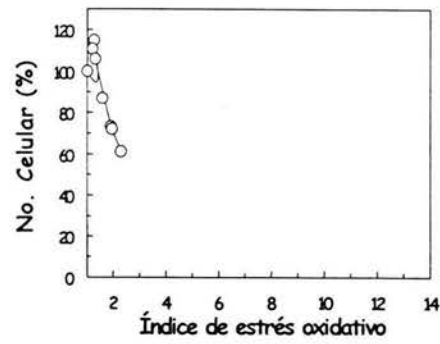
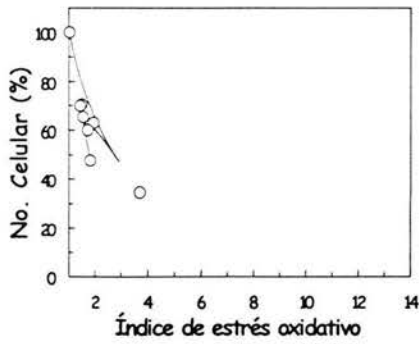
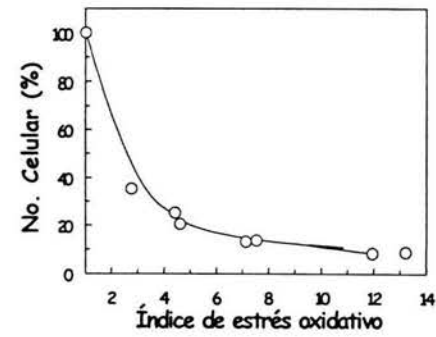
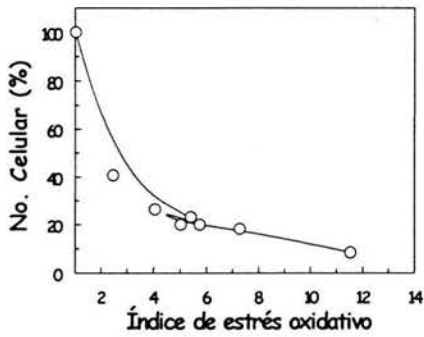
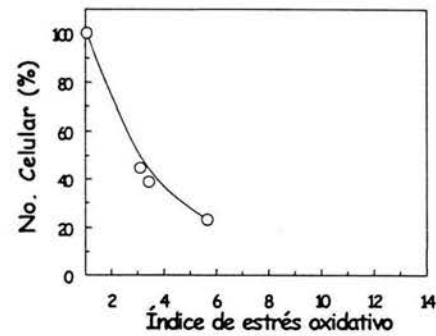
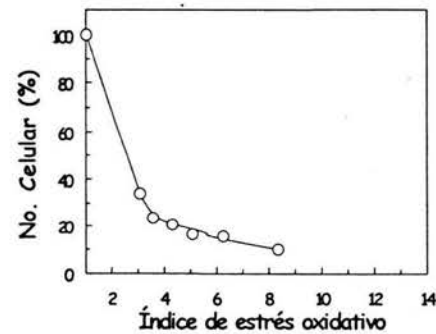
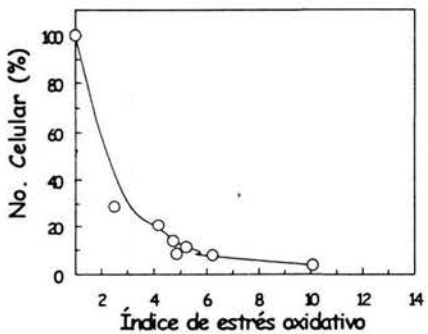
A**B****C****D**

Figura 12. Curva que se obtuvo al graficar los índices de estrés oxidativo de la figura 11 vs. el porcentaje de las células respecto al control sin tratar. En A (24 h), B (36 h) y D (48 h) cada gráfica se refiere a cada uno de los experimentos independientes. En C se graficaron, a la izquierda los datos de 24 h y a la derecha los de 36 h.

Agentes antioxidantes pueden inhibir parcialmente la muerte que causa el $\text{TNF}\alpha$

Si el aumento de las especies reactivas de oxígeno participa en la citotoxicidad que se induce por el $\text{TNF}\alpha$, las moléculas con capacidad antioxidante deberían aumentar la resistencia de las células L929-P6 al efecto citotóxico de la citocina.

Se probaron seis compuestos, y se encontró que cuatro de ellos son capaces de conferir resistencia parcial al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ (tabla 4).

Los antioxidantes que se utilizaron son de dos tipos. El DTT, el DTE y el 2-mercaptoetanol son agentes reductores y funcionan al donar electrones principalmente a grupos sulfhidrilos, lo que inclina el estado redox de la célula hacia la reducción. Este grupo de moléculas no tiene ningún efecto sobre la cantidad de especies reactivas ya existentes en un momento dado, ni sobre el daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

En un segundo grupo se encuentran los antioxidantes como el fenol, el DMSO y la tirosina capaces de atrapar electrones no apareados y estabilizarlos. A diferencia de los reductores, estos compuestos pueden interferir con las reacciones en cadena que culminan en daño celular masivo por oxidación. De cualquier forma, el daño oxidativo sobre macromoléculas y organelos, una vez que ocurre, es prácticamente irreversible.

Dadas estas características, es de esperar que los agentes reductores como el DTT sean más efectivos de manera previa a la generación del estrés oxidativo, mientras que trampas de electrones como el fenol funcionen mucho mejor en el momento en que los radicales libres están presentes y no antes ni después.

Tabla 4. Efecto de antioxidantes sobre la viabilidad celular de los fibroblastos L929-P6 en presencia de 5 ng/ml del TNF α durante 48 h. La viabilidad se calculó como el porcentaje de las células que excluyen azul tripano con respecto al control sin la citocina.

Antioxidante	Concentración	% de viabilidad
DTT	0.6 mM	52.6 \pm 1.99
DTE	0.6 mM	75.38 \pm 9.87
Fenol	0.06%	62.72 \pm 16.12
DMSO	1%	87.03
Tirosina	1mM	0
2-mercaptoetanol	1mM	0

Esto se probó por medio de curvas temporales de adición para ambos compuestos, en los que se midió la viabilidad a las 48 h después de añadir el TNF α . El tiempo óptimo de adición del DTT con respecto al TNF α resultó ser a las 0 h (figura 13A), lo cual indica que el estrés oxidativo, que al parecer se revierte parcialmente por la molécula, ocurre muy rápidamente después de añadir la citocina.

En cuanto a la adición del fenol, el efecto máximo se observó a partir de 2 h después de poner el TNF α , y aún a las 8 h se mantiene la protección máxima (figura 13B). Cuando el fenol se adicionó más allá de las 12 h el número celular ya fue similar al del control sin fenol (datos no mostrados).

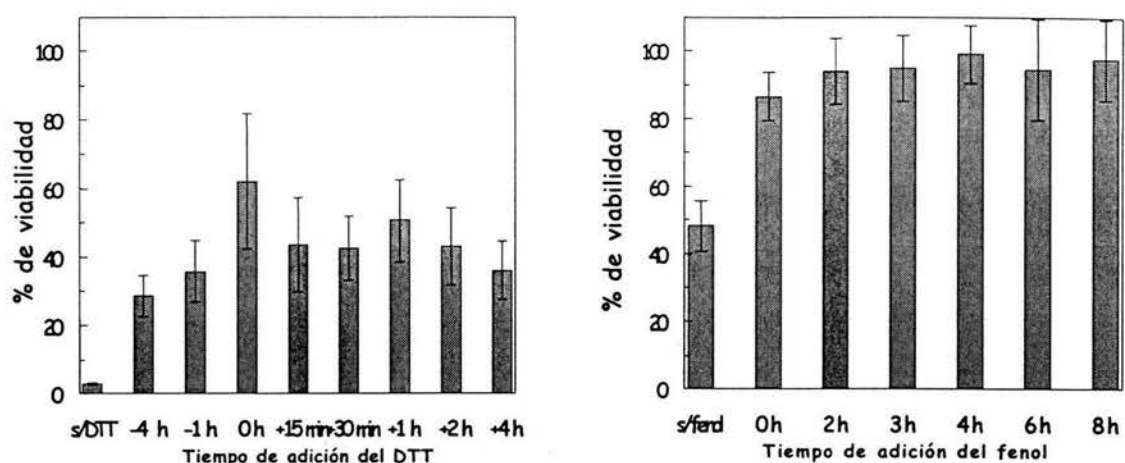


Figura 13. Curvas temporales de adición de antioxidantes a cultivos de L929-P6 que se trataron con el $TNF\alpha$. (A) El DTT (1 mM) y (B) el fenol (0.03%) se adicionaron a los cultivos en diferentes momentos con respecto a la adición del $TNF\alpha$ (5 ng/ml) y la viabilidad se calculó como el porcentaje del cristal violeta pegado al plato con respecto al control sin tratar a las 48 h después del comienzo del tratamiento con la citocina.

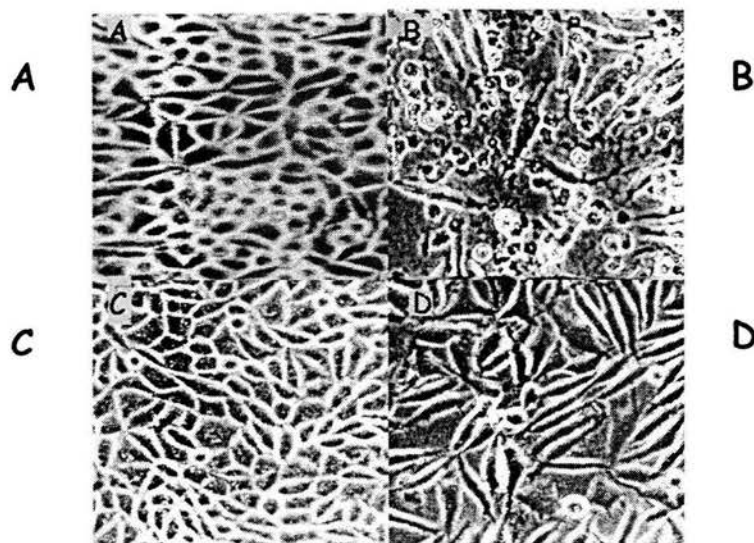


Figura 14. Protección parcial del fenol contra el efecto citotóxico del $TNF\alpha$ sobre las células L929. Microfotografía (10X) que se tomó a las 48 h de tratamiento (A) sin tratamiento, (B) $TNF\alpha$ (5 ng/ml), (C) fenol (0.03%) y (D) $TNF\alpha$ +fenol.

En la figura 14 se puede ver el aspecto de un cultivo tratado 48 h con el $\text{TNF}\alpha$ en comparación con uno en presencia del $\text{TNF}\alpha$ +fenol. Notablemente, en el cultivo con el $\text{TNF}\alpha$ y fenol las células se observaron en perfecto estado, sin embargo su número fue claramente menor que el del control que sólo tenía fenol. Esto puede indicar que el fenol bloquea la muerte, pero no la actividad citostática del $\text{TNF}\alpha$, y ésta se asocia quizá a una dosis baja del estrés.

La protección parcial contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ que se asocia a distintas causas correlaciona con una disminución en el estrés oxidativo

Otra estrategia para determinar si la generación de especies reactivas de oxígeno -que causa el $\text{TNF}\alpha$ - tiene o no relación con la muerte celular, fue analizar diferentes clones de los fibroblastos L929 que muestran una resistencia parcial a la muerte que induce el $\text{TNF}\alpha$.

Las clones que se analizaron presentan esta protección parcial por distintas causas. Las clones A2, A3, A4, A5, B1, B2 y C2 se seleccionaron como resistentes parciales al $\text{TNF}\alpha$ después de someter la población heterogénea original de los fibroblastos L929 a procesos de transfección.

En la figura 15A se muestra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ a lo largo del tiempo sobre la clona A4 en comparación con el efecto sobre la clona L929-P6, sensible al $\text{TNF}\alpha$. Como puede observarse, aunque la viabilidad de la clona A4 es mayor a la de la clona P6, la resistencia no es total y al parecer la muerte sólo se retrasa.

Las clones D1, D3 y D5 se aislaron como resistentes parciales al $\text{TNF}\alpha$ después de someter la clona L929-P6 a procesos de transfección. Previamente, se reportó que los inhibidores de la síntesis de RNA o proteínas aceleran el

proceso citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ y aumentan la sensibilidad de las células L929 a la citocina (Branch, D. R. *et al.*, 1991), por estas razones se probó el protocolo de la muerte en presencia de la actinomicina D. Estos experimentos eran importantes ya que una posible explicación a la resistencia era la disminución o desaparición de los receptores al $\text{TNF}\alpha$, aunque es posible que los receptores estén presentes sólo en presencia de la actinomicina D. En estas clonas también se midió la viabilidad después de tratamiento con el H_2O_2 , ya que se trataba de explorar si las células resistentes al factor también eran resistentes a un estrés oxidativo que se genera de manera independiente al $\text{TNF}\alpha$.

Los resultados que obtuvo la QFB Criselda Mendoza en cuanto a la traslocación al núcleo del factor de transcripción $\text{NF}\kappa\text{B}$, indicaron que la protección parcial que se observa no tiene relación con la desaparición o el funcionamiento defectuoso de los receptores. Así mismo, la protección parcial en estas clonas se extiende a la citotoxicidad que causa un agente directamente oxidante como el peróxido de hidrógeno, lo que indica la importancia del estrés oxidativo en la muerte que induce en este sistema el $\text{TNF}\alpha$ (figura 15B).

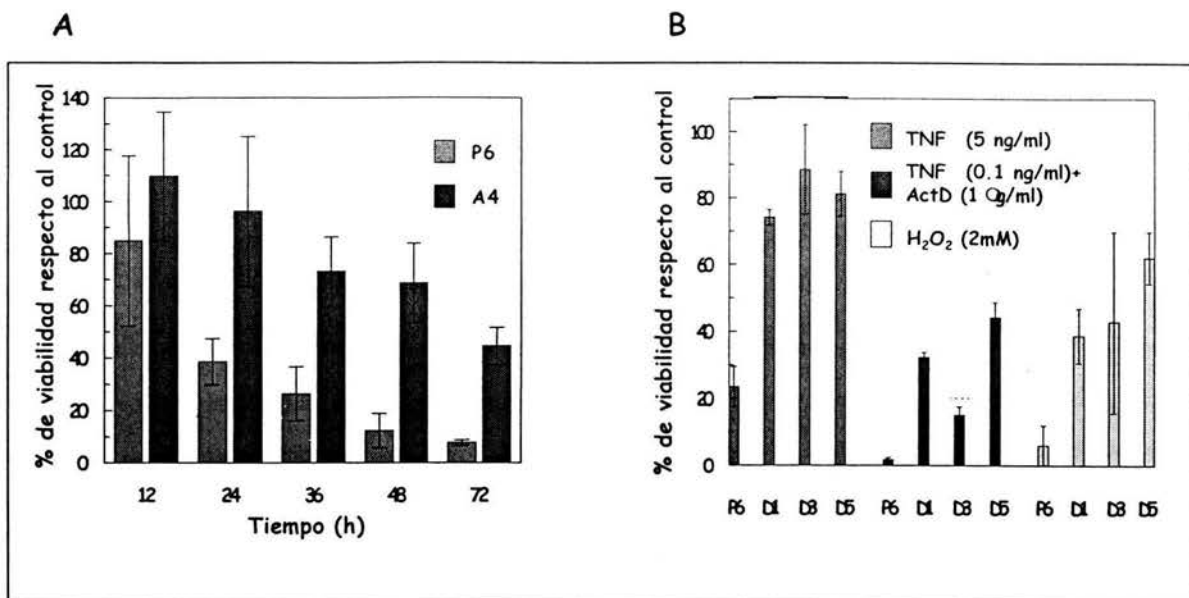


Figura 15. (A) Efecto en el tiempo del TNF α sobre las clonas P6 y A4. (B) Resistencia al TNF α , al TNF α +ActD y H₂O₂ de las clonas P6, D1, D3 y D5. En ambos experimentos la viabilidad se midió por exclusión de azul de tripano (48 h para TNF α , 12 h para TNF α + ActD y 4 h para el H₂O₂).

El siguiente paso consistió en buscar una correlación entre la protección o resistencia parcial y el índice de estrés oxidativo, que se calculó como se explicó anteriormente: (reducción del MTT/no. de células viables al término del experimento) / (reducción del MTT/no. de células viables del control). Las clonas resistentes al TNF α mostraron un índice inferior a 2 después de 36 h de tratamiento con la citocina, incluida la clona EE29, que se obtuvo por mutagénesis química a partir de la clona sensible L929-CR1 (experimentos que realizó la QFB Criselda Mendoza Milla) (tabla 5).

Esta correlación entre un índice de estrés oxidativo menor a 2 y protección parcial ocurre también cuando las células se tratan con el TNF α + Actinomicina D, o con las ceramidas sintéticas que se utilizaron para imitar el

efecto de la citocina, ya que la ceramida es un segundo mensajero que participa en la señalización de la citotoxicidad que causa el TNF α (tabla 5).

Tabla 5. Resumen de varios experimentos que muestra la relación entre la viabilidad y el índice de estrés oxidativo de clonas sensibles y resistentes a los tratamientos con el TNF α , el TNF α + Act D y ceramida.

* Ceramidas sintéticas de cadena corta (C2, C6 y C8)

Tratamiento	Clona	Viabilidad (% respecto al control)	Periodo de tratamiento (h)	Índice de estrés oxidativo
TNF α (5 ng/ml)	P6	13	36	7.7
	D1	47	36	1.7
	D3	45	36	1.7
	D5	63	36	1.7
	A4	72	36	1.0
	CR1	16	36	5.5
	EE29	58	36	1.6
TNF α +Act D (0.1 ng/ml+1 μ g/ml)	P6	7	12	9.3
	D1	75	12	1.2
	D3	22	12	4.2
	A4	41	12	2.4
Ceramida* (25 μ M)	P6	11	15	9.1
	D1	42	15	1.2
	D3	44	15	2.5
	D5	42	15	2.1
	A4	79	15	1.1
	CR1	24	15	3.0
	EE29	23	15	3.3

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

El TNF α induce también un estrés oxidativo temprano detectable por DCF que no tiene relación directa con la citotoxicidad

Existen reportes de que el TNF α genera especies reactivas de oxígeno en las primeras horas después de aplicar el estímulo (Hennet, T. *et al*, 1993). Sin embargo, en los experimentos de reducción del MTT, el estrés oxidativo se detectó después de 12 h de tratamiento. Dado que el MTT sólo capta electrones de un potencial de óxido reducción alto, se utilizó 2',7'-diclorofluorescina (DCFH) en su forma diacetato (DCFH-DA), que al igual que el MTT es permeable a las células, para examinar la posible presencia de electrones con potencial redox menor. Al oxidarse, el DCFH se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia a 520 nm (cuando se excita a 480 nm), por lo que la intensidad de la fluorescencia a esta longitud de onda es proporcional a la concentración de las especies reactivas de oxígeno presentes en el interior de la célula.

En la figura 16 se muestra un experimento en el que las células L929-P6 se trataron con el TNF α durante distintos lapsos de tiempo y luego se cargaron con DCFH. El aumento en la intensidad de fluorescencia que se observa como un corrimiento a la derecha y se debe a la oxidación de la molécula, es detectable desde la primera hora de tratamiento, y alcanzó el máximo entre las 12 y 36 h. Es de suponerse entonces que el TNF α induce la formación de especies reactivas de oxígeno, posiblemente radicales hidroxilo aunque no es posible descartar otras como peroxinitritos (Possel, H. *et al*, 1997), desde tiempos muy tempranos.

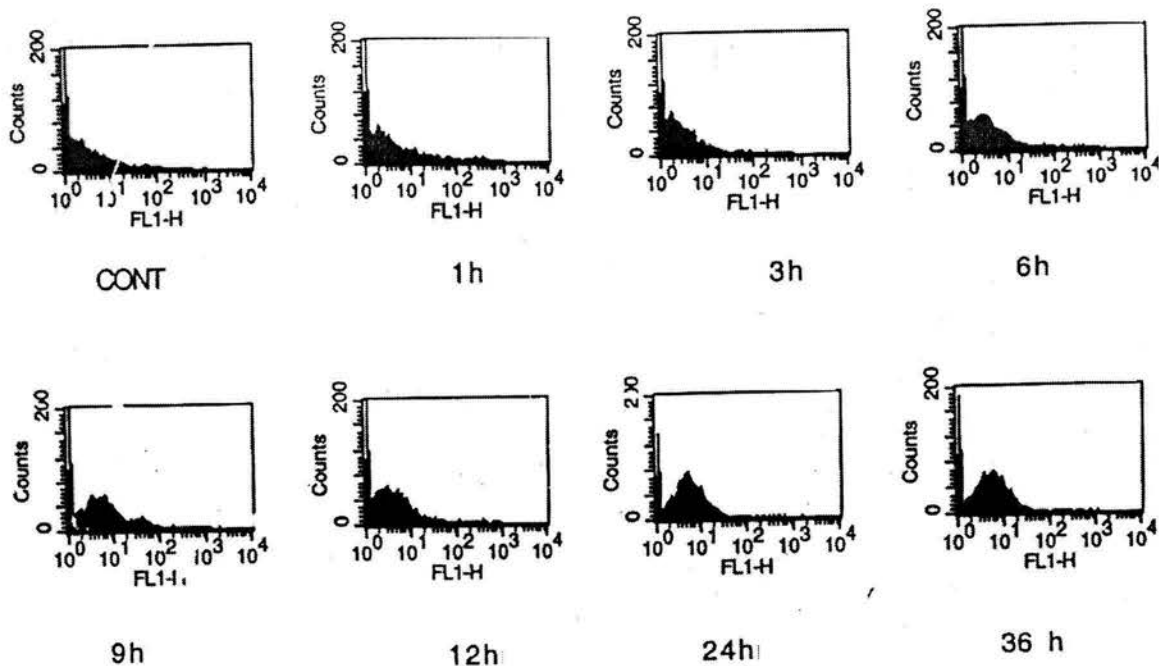


Fig. 16. Efecto del $\text{TNF}\alpha$ en la aparición temprana de especies reactivas de oxígeno en las células L929-P6 que se detectan por la fluorescencia del DCF. Histogramas resultantes de la citofluorimetría. En el eje de las x se grafica la intensidad de fluorescencia a 520 nm y en el eje de las y se grafica el número de eventos en cada intensidad de fluorescencia. Las células se trataron como se describe en el texto y se analizaron de acuerdo a la descripción que aparece en materiales y métodos.

Cuando se comparó la oxidación del DCFH en las clonas resistentes D1, D3 y D5 con la que se observa en la clona L929-P6 (figura 17) se evidenciaron dos fenómenos: Por un lado se observó que las clonas resistentes presentan una mayor intensidad de fluorescencia basal que las células control no expuestas al $\text{TNF}\alpha$ (figura 17, histogramas de la izquierda). Por otro lado, después de añadir el $\text{TNF}\alpha$ no se advierten diferencias notables entre las células resistentes y la sensible (figura 17B). Esto refuerza la idea de que este estrés oxidativo no tiene relación directa con el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$, aunque esto no significa que pueda ser un prerrequisito sin el cual la muerte no ocurre.

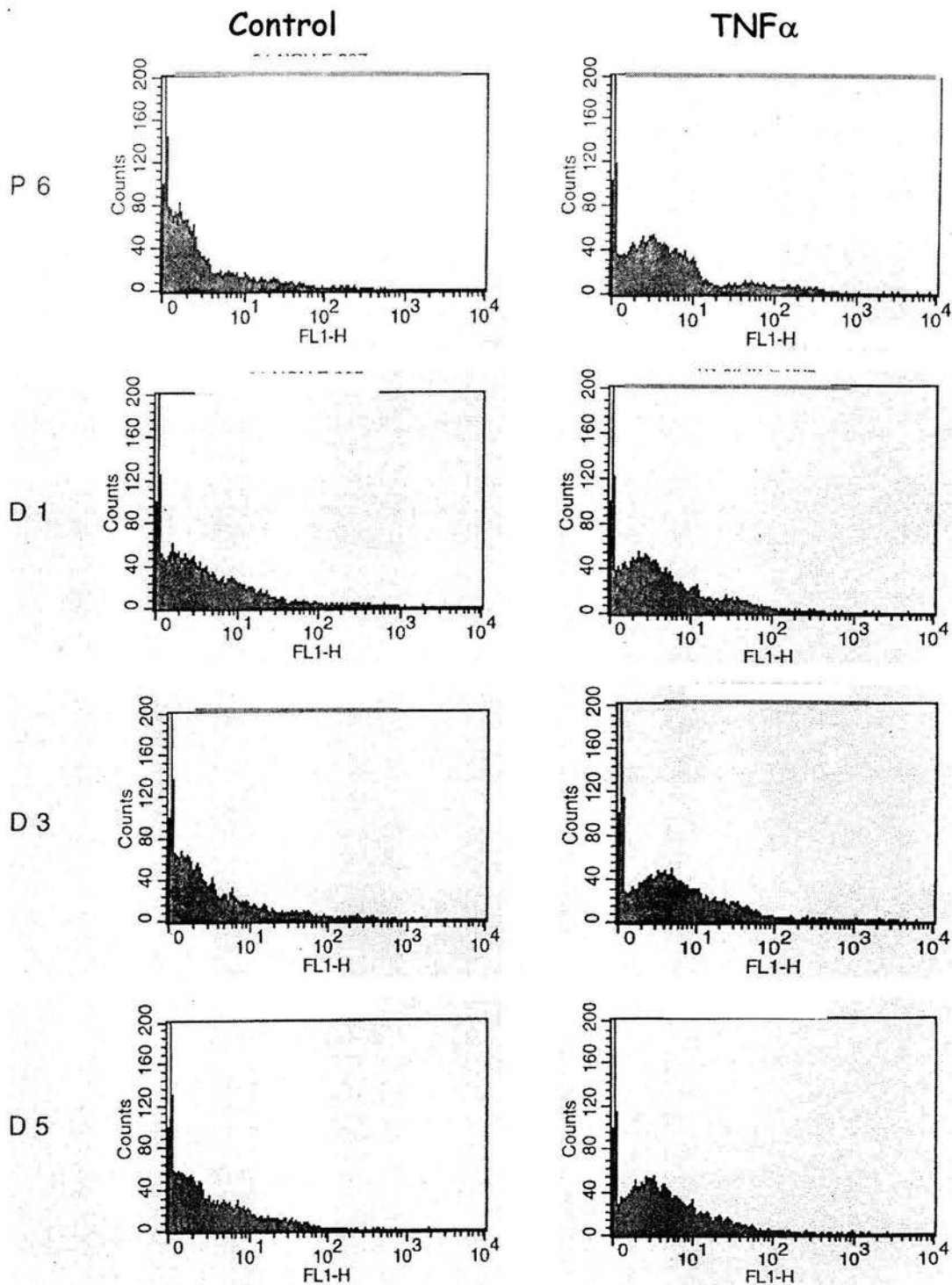
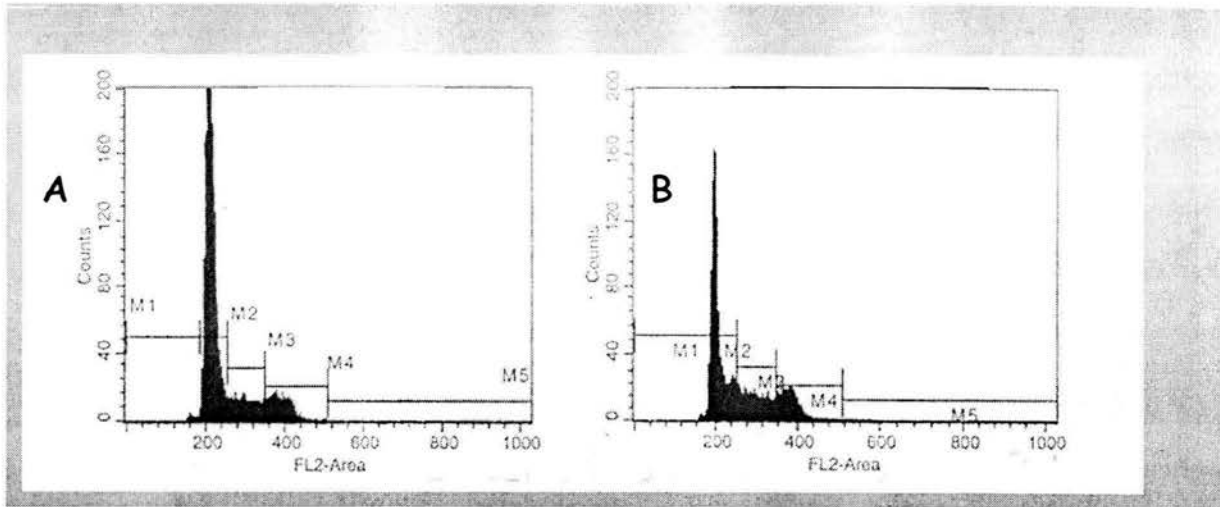


Figura 17. Efecto del $\text{TNF}\alpha$ en las células sensibles (P6) y resistentes (serie D) sobre la formación de especies reactivas de oxígeno que se detectan por DCF. El eje de las x corresponde a la intensidad de fluorescencia a 520 nm y en el eje de las y se indica el número de eventos (células) que presentan determinada intensidad de fluorescencia.

El $\text{TNF}\alpha$ parece evitar que las células completen la fase S del ciclo celular

Desde el comienzo de estos estudios fue evidente que la totalidad de las células morían en un lapso de tiempo muy largo. Las primeras células comienzan a morir entre las 18 y 24 h, y el número de las células viables disminuye continuamente hasta que aproximadamente a las 48 h llega a cero. Puede ser que esto ocurra a causa a una variación intrínseca del cultivo y dado que las células no se sincronizaron con respecto al ciclo celular, lo más obvio es pensar que al entrar en contacto con el $\text{TNF}\alpha$, las células se encuentran en distintos puntos de este ciclo.

Como una primera aproximación a la posible relación entre el ciclo celular y la muerte se analizó la distribución en el ciclo celular de las células asincrónicas después de exponerlas a la citocina. Esto se llevó a cabo al medir el contenido celular de DNA por medio de citofluorometría de flujo (ver materiales y métodos). Las células control presentaron el patrón característico de las células proliferantes (figura 18A), en cambio, la citometría de las células con tratamiento (figura 18B) mostró una disminución en el número de las células en G_0/G_1 ya que en esta fase del ciclo sólo se encontraban el 66% de las células que se trataron con el $\text{TNF}\alpha$ (figura 18C), en comparación con el 76% de las células control. También se observa una mayor cantidad de las células en S (incremento del 9% respecto del control). En cuanto a G_2/M , la diferencia no es significativa y lo más notable es el corrimiento del pico hacia la izquierda, lo que podría indicar que las células no completan su fase S y por lo tanto no entran en G_2/M .



C

Distribución porcentual			
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	77	12	11
+TNF α	66	21	13
Decremento	11		
Incremento		9	2

Figura 18. Efecto del TNF α sobre la distribución de las células en el ciclo celular. Las células se trataron 24 h con 1 ng/ml de la citocina. Las regiones M1 a M5 se fijaron para distinguir las células con un contenido de DNA menor a un juego haploide o sub-G₀/G₁ (M1), las células en G₀/G₁ (M2), las células en S (M3), las células en G₂/M (M4) y agregados celulares (M5).

Una pregunta que surgió entonces fue si las células son más sensibles al TNF α en alguna de fase particular del ciclo. De los resultados anteriores puede pensarse que al disminuir las células en G₂/M quizá mueren en alguno de estos puntos o al final de S. Para consolidar estas observaciones se realizaron varios experimentos en los que se intentó sincronizar a las células en G₀/G₁.

En un primer experimento se añadió el $\text{TNF}\alpha$ al cultivo en diferentes intervalos de tiempo (figura 19). Cuando el $\text{TNF}\alpha$ estuvo en contacto con las células las últimas 12 h del proceso de sincronización y se eliminó cuando las células se resembraron en condiciones proliferantes (ver materiales y métodos), no se observó ningún efecto citotóxico sobre el cultivo.

Cuando se les añadió el $\text{TNF}\alpha$ a partir de que las células empezaron a ciclar y se les dejó por 36 h, y se observó un número celular cercano al 50% respecto al control sin tratamiento. Resultó notable que visualmente las células se encontraban en perfectas condiciones y que tampoco se observaran fragmentos celulares. Esto llevó a pensar que el efecto sobre el número celular parece deberse más bien a citostasis y no a citotoxicidad. Además, en comparación con las células asincrónicas que se trataron durante el mismo lapso de tiempo, el número celular fue mucho mayor.

Estas observaciones apoyan la idea de que las células no completan su ciclo y no se dividen en presencia del $\text{TNF}\alpha$. Por lo tanto, el 50% de las células con respecto al control sólo refleja el hecho de que los controles se dividieron mientras que las células con tratamiento no lo hicieron.

En el caso de las células que recibieron tratamiento durante 12 h en diferentes intervalos entre 0 y 36 h, los porcentajes del número celular con respecto a control están todos cerca del 50%.

Cuando se dejó el $\text{TNF}\alpha$ durante las segundas 36 h, la viabilidad cayó incluso por debajo de las asincrónicas con tratamiento durante el mismo tiempo, lo que sugiere que durante este periodo la desensibilización no sólo desaparece sino que incluso se observa que las células son mucho más susceptibles al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$.

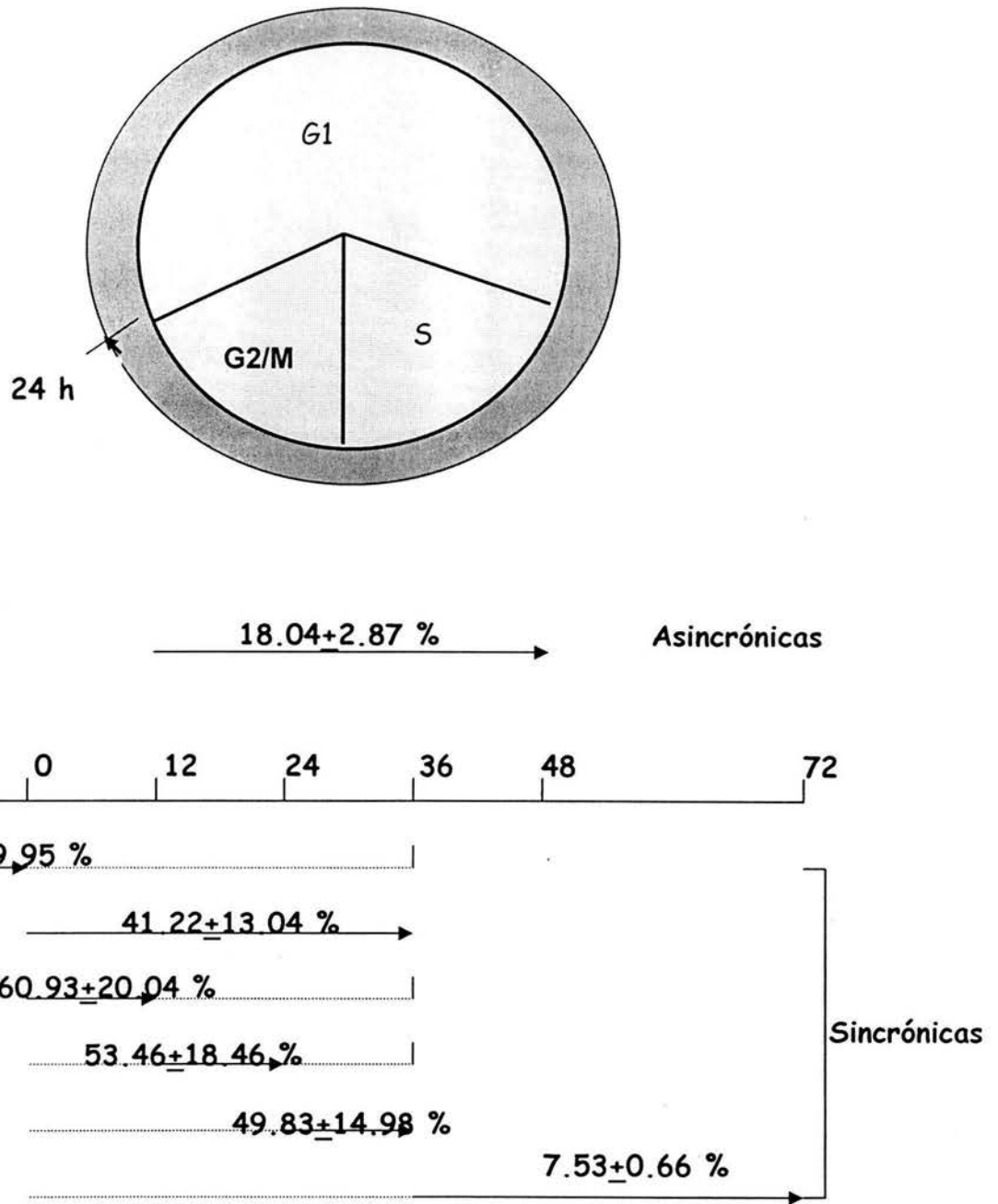


Figura 19. Efecto de pulsos del TNF α sobre la viabilidad de las células L929-P6 sincrónicas. Las células asincrónicas se trataron durante 36 h con el TNF α (5 ng/ml), sobre la flecha se indica la viabilidad al término del tratamiento. En el caso de las sincrónicas, el tiempo 0 es el momento en que las células comenzaron a ciclar, la flecha indica el periodo en el que el cultivo estuvo en presencia de la citocina y la flecha + la línea punteada se refieren al tiempo total del cultivo hasta que se evaluó la viabilidad. El número celular se obtuvo por exclusión de azul tripano y se indica como porcentaje de las células con respecto al control sobre la flecha correspondiente.

El efecto citostático del $\text{TNF}\alpha$ correlaciona con un índice de estrés de 2

Para comprobar que las células sincrónicas no mueren en las primeras 36 h se realizó el siguiente experimento: aunado al conteo celular se midió la actividad en el medio de cultivo de una enzima citoplásmica (lactato deshidrogenasa) como indicativo de la integridad de la membrana.

El conteo celular de los cultivos sincrónicos y asincrónicos que se trataron durante 12, 24, 36, 48 y 72 h se grafica en la figura 20A y C, respectivamente. En el caso de los cultivos sincrónicos el número celular permaneció constante hasta las 36 h y sólo hasta las 48 h disminuyó la cantidad de células. En cambio, los cultivos asincrónicos ya comenzaron a morir desde las 24 h.

Si se examina el porcentaje de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) que se libera al medio de los cultivos sincrónicos encontramos que la actividad de la enzima es similar entre los cultivos que se trataron y los controles hasta las 36 h (figura 20B). La actividad enzimática en el medio de los cultivos asincrónicos en presencia del $\text{TNF}\alpha$ fue claramente mayor que en los controles desde las 12 h (figura 20D).

Estos resultados demuestran que las células sincrónicas realmente no mueren sino hasta después de las 36 h; aún así el $\text{TNF}\alpha$ tiene un efecto, ya que no permite que las células se dupliquen. Por tanto, el proceso de sincronización permitió disociar el efecto antiproliferativo o citostático del efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$, y además se demostró que la citostasis precede a la muerte.

En el siguiente experimento se analizó el índice de estrés oxidativo de las células sincrónicas y asincrónicas que se trataron con el $\text{TNF}\alpha$. En los cultivos sincrónicos las células que estuvieron 36 h en contacto con la citosina

presentaron un índice de 2. El mismo tratamiento en cultivos asincrónicos provocó la muerte de las células y este efecto se acompaña de un índice de estrés oxidativo de 6. A partir de las 48 h, cuando ya hay células muertas en el cultivo sincrónico, el índice de estrés oxidativo también aumenta por encima de 2.

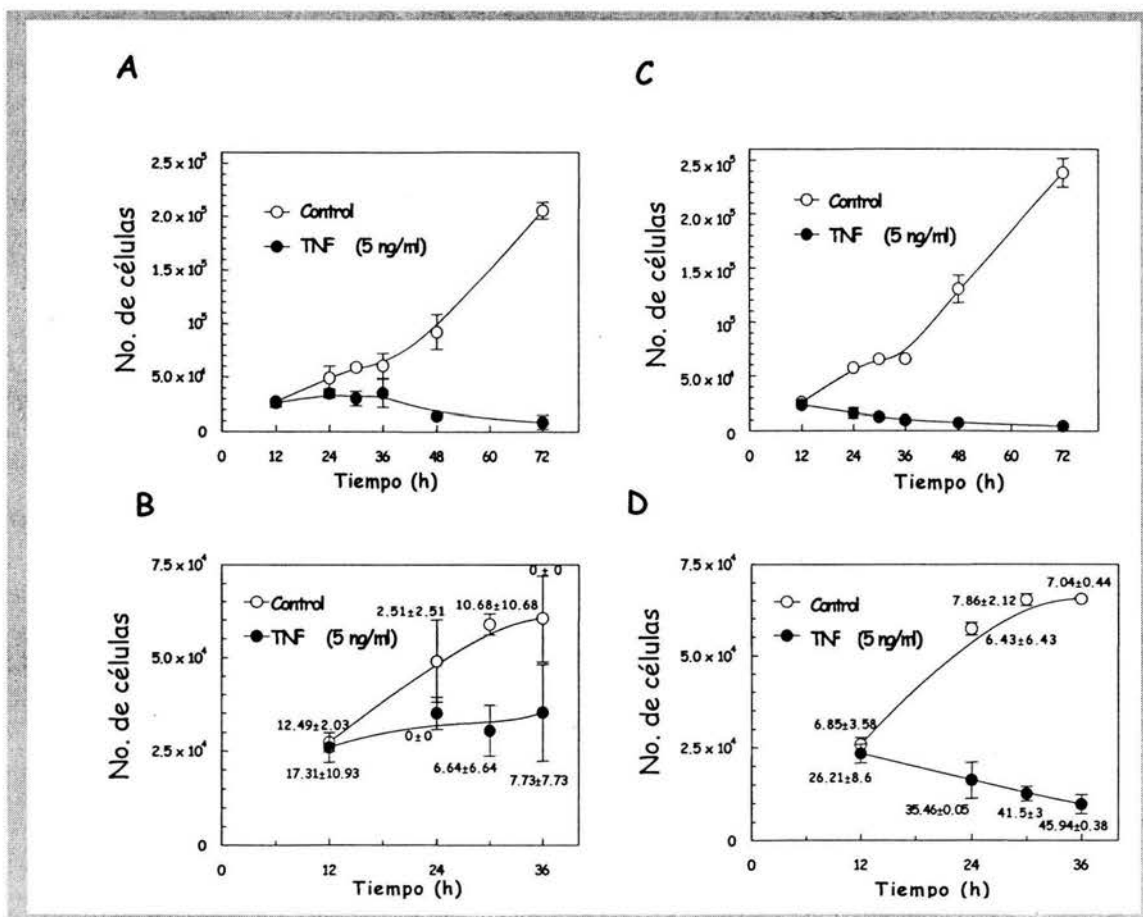


Figura 20. Viabilidad de las células sincrónicas y asincrónicas que se trataron con el TNF α . A) Cultivo sincrónico, C) Cultivo asincrónico, B) Ampliación de la gráfica A entre las 12 y las 36 h, se indican los valores de LDH que se liberó al medio, D) Ampliación de la gráfica B entre las 12 y las 36 h, se indican los valores de LDH que se liberó al medio. El número celular se obtuvo por exclusión de azul de tripano en todos los casos.

El TNF α causa un aumento en la incorporación de [3 H]-timidina

Para dilucidar si el efecto citostático del TNF α ocurre en alguna fase del ciclo celular, específicamente en G₁, se realizó el siguiente experimento: Una forma de saber si las células se detienen en G₁ y por lo tanto no sintetizan DNA es medir la incorporación de [3 H]-timidina en de las células.

En el experimento se utilizaron tres concentraciones del TNF α y las células se trataron durante 18 h. En la figura 21 se analiza la distribución en el ciclo celular por medio de citofluorometría de flujo y se observa, como en los experimentos anteriores, que las células completan cada vez menos la fase S conforme aumenta la dosis. También es notable el corrimiento a la izquierda del pico en 400 unidades de fluorescencia que corresponde a G₂/M (que corresponde al doble del contenido de DNA de las células en G₁ que se ajustó a 200 unidades de fluorescencia).

En la tabla de la figura 22 se muestra el efecto del TNF α a las diferentes concentraciones. En el experimento con la concentración más baja (0.07 ng/ml), coinciden un 50% en el número celular, una actividad de LDH similar a la del control y un índice de estrés oxidativo de 2 (figura 22C). Cuando el número celular cae, la actividad de LDH aumenta, así como la reducción del MTT.

En cuanto a la incorporación de [3 H]-timidina, se observó un aumento por número de célula. Este aumento llega al doble cuando los cultivos se tratan con 5 ng/ml de la citocina. En vista de que el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo no mostró un aumento del doble en las células en la fase S, el aumento en incorporación de [3 H]-timidina al DNA puede deberse a un aumento en la reparación del DNA. Es posible que esta reparación sea

consecuencia de aumento en el daño a DNA que causan los radicales libres que se generan en respuesta al $\text{TNF}\alpha$. Es importante notar que aún el tratamiento con 0.07 ng/ml del $\text{TNF}\alpha$ tiene efecto sobre la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina. Es decir, parecería que las dosis bajas de especies reactivas de oxígeno que causan la citostasis, producen también daño al DNA.

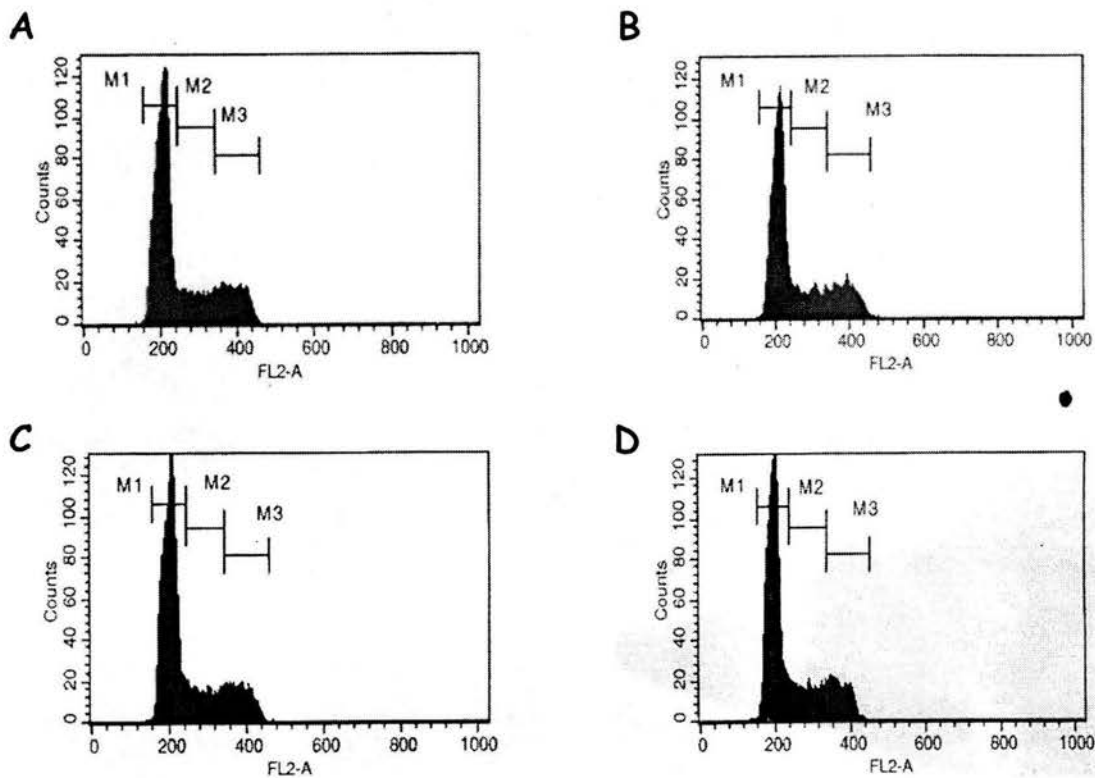


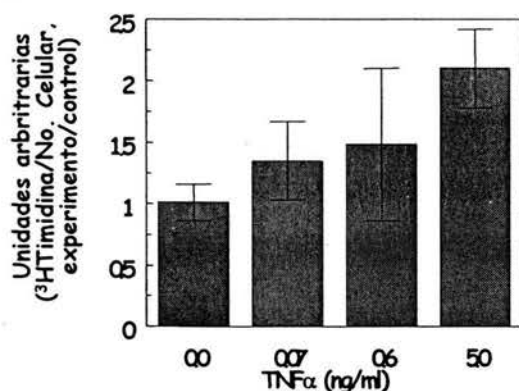
Figura 21. Citometría de las células que se trataron durante 18 h con el $\text{TNF}\alpha$. A) Control sin tratar, B) 0.07 ng/ml, C) 0.6 ng/ml y D) 5 ng/ml. M1, M2 y M3 se asignaron para agrupar las células en fase G_0/G_1 , S y G_2/M respectivamente.

A

TNF α (ng/ml)	Viabilidad celular (% respecto a control)	Actividad de LDH* (% que se libera)	Reducción del MTT**	Incorporación de [3 H]-timidina***
0	116.68 \pm 11.08	0.0243 \pm 0.0004 (15.85 \pm 0.76)	0.5648 \pm 0.009 (4.87 \pm 0.42)	2568.75 \pm 239.36 (22.16 \pm 2.53)
0.07	60.28 \pm 4.0 (51.98 \pm 5.37)	0.0287 \pm 0.0092 (18.53 \pm 7.66)	0.558 \pm 0.019 (9.29 \pm 0.59)	1827 \pm 305.47 (30.41 \pm 4.34)
0.6	39.2 \pm 6.04 (33.81 \pm 5.38)	0.66 \pm 0.0094 (43.81 \pm 4.99)	0.5471 \pm 0.015 (14.2 \pm 2.08)	1252.83 \pm 89.38 (32.52 \pm 5.11)
5.0	19.32 \pm 0.92 (16.68 \pm 1.59)	0.0856 \pm 0.0067 (42.33 \pm 1.92)	0.5141 \pm 0.016 (26.63 \pm 1.3)	892.5 \pm 137.89 (46 \pm 5.86)

*U/ml **Abs₅₇₀₋₆₃₀/No. de células viables ***cpms/No. de células viables

B



C

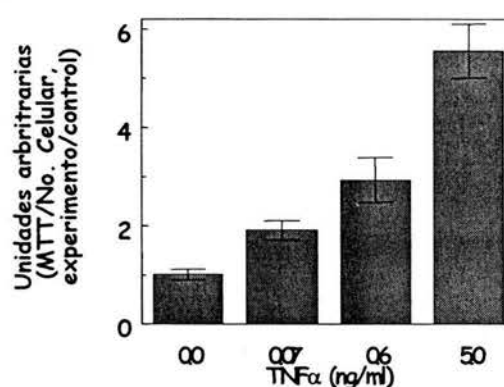


Figura 22. Efecto del TNF α sobre la incorporación de [3 H]-timidina. A) Tabla que muestra el efecto de la concentración del TNF α sobre el número de las células viables, la liberación de LDH, el estrés oxidativo y la incorporación de [3 H]-timidina. El tratamiento con el TNF α fue de 18 h. B) Gráfica que muestra el efecto de la dosis del TNF α sobre el índice de reparación en el mismo experimento. C) Gráfica que muestra la dependencia del índice de estrés oxidativo con respecto a la dosis del TNF α en el mismo experimento.

El tratamiento con el $TNF\alpha$ de las células L929-P6 que se sincronizaron no provoca cambios en el ciclo celular ni en la generación temprana de especies reactivas de oxígeno

Con la finalidad de examinar si las células L929-P6 que se sincronizaron muestran un comportamiento diferente a las células asincrónicas en la distribución en el ciclo celular cuando se tratan con el $TNF\alpha$, se trataron las células sincrónicas y asincrónicas con la citocina y se analizaron por citometría de flujo. En la figura 23 se muestran los resultados de este experimento: con las células asincrónicas obtuvimos resultados similares a los que observamos anteriormente (fig. 23B), mientras que en el caso de las sincrónicas no se observa un cambio en la distribución de las células en el ciclo por efecto del $TNF\alpha$ (fig. 23D). También es de notar que si bien, por los experimentos anteriores de viabilidad celular en combinación con los experimentos de liberación de LDH, se sabe que las células que se sincronizan y se tratan con el $TNF\alpha$ no se duplican, estas células no se detienen en la fase G_1 .

Estos resultados correlacionan con la sensibilidad al efecto citotóxico del $TNF\alpha$ con los cambios que se observan en la distribución de las células en el ciclo.

Por último, se trataron con la citocina las células sincrónicas y asincrónicas para elucidar si en las células sincrónicas se generan especies reactivas de oxígeno de aparición temprana de forma similar a lo que ocurre en las células los diferentes tratamientos y se leyó la fluorescencia que emite la molécula al oxidarse y convertirse en DCF.

Uno de los hallazgos más importantes en este experimento fue que en las células que se sincronizaron ya están presentes las especies reactivas desde el tiempo 0, es decir el momento en que los cultivos empiezan de nuevo a ciclar y

aún no reciben el tratamiento con el $\text{TNF}\alpha$ (fig. 24B). Aún a las 24 h se observó que en las células sincrónicas se genera una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno incluso sin tratamiento (fig. 24E y F). Estos datos apoyan los resultados anteriores con las clonas resistentes al $\text{TNF}\alpha$ por transfección.

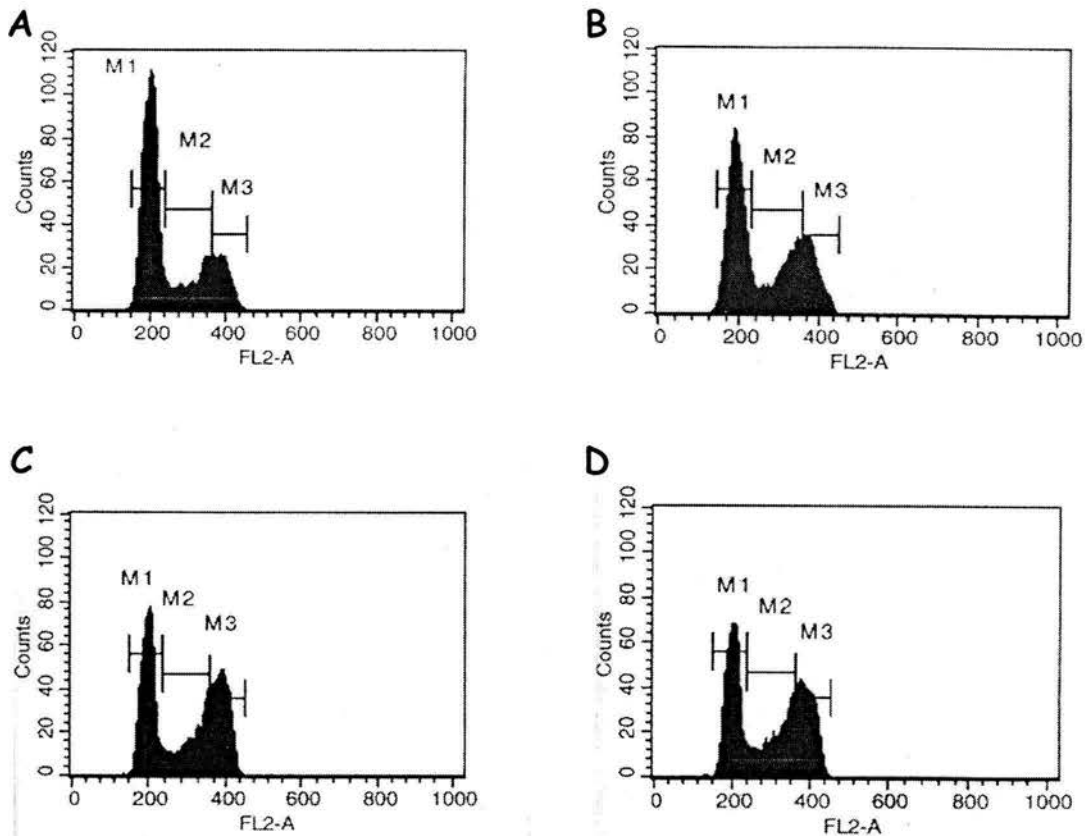


Figura 23. Análisis del ciclo celular de las células que se trataron con el $\text{TNF}\alpha$. (A) y (C) células L929-P6 asincrónicas, (A) sin tratar y (C) en presencia de 5 ng/ml del $\text{TNF}\alpha$; (B) y (D) células que se sincronizaron, (B) sin tratar y (D) en presencia de 5 ng/ml de la citocina. M1, M2 y M3 se asignaron para agrupar las células en fase G_0/G_1 , S y G_2/M respectivamente.

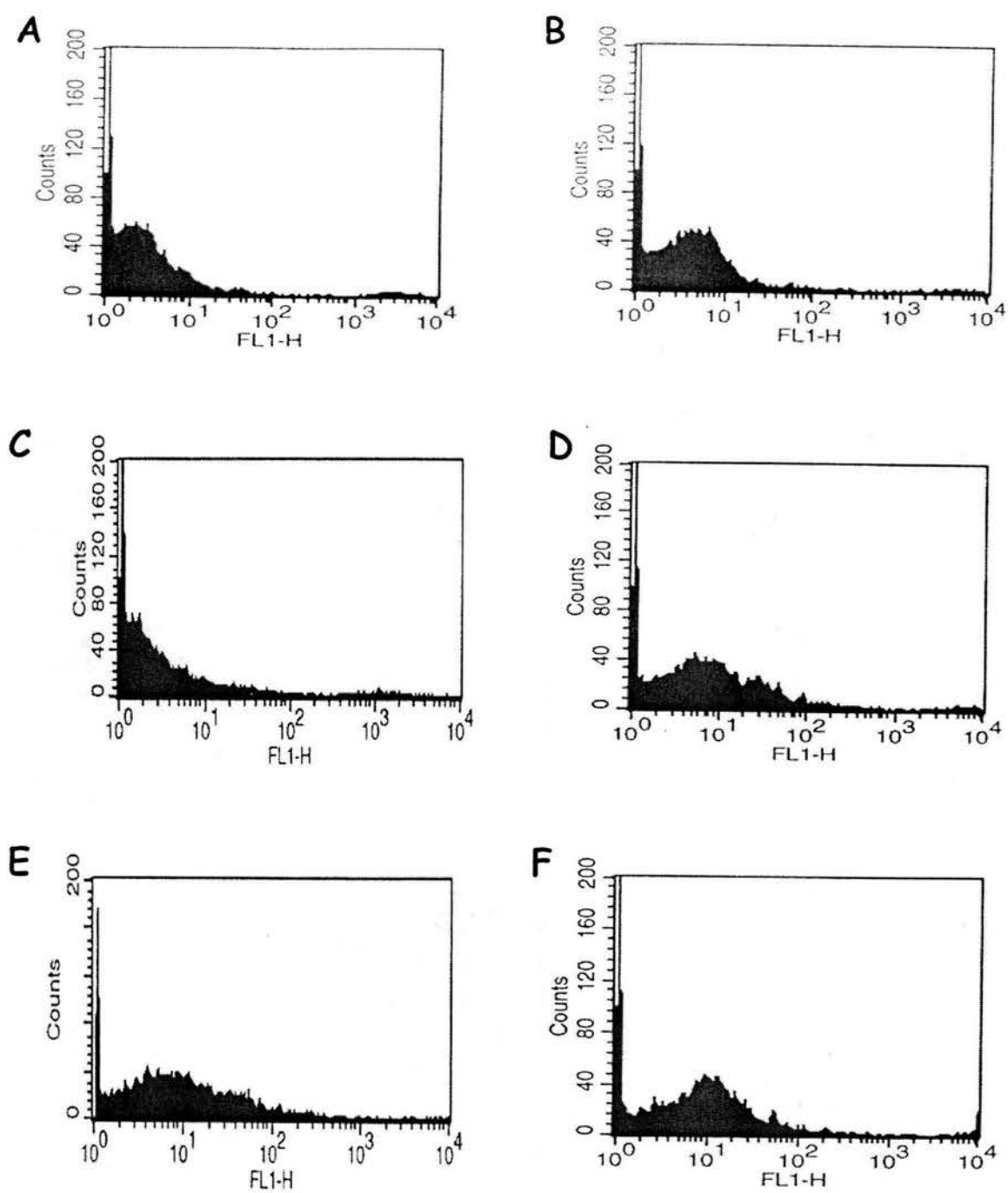


Figura 24. **Generación de especies reactivas que se detectan por DCF en las células asincrónicas y sincrónicas.** Células asincrónicas (A, C y E) al tiempo 0 (A) y a las 24 h sin tratar (C) y con 5 ng/ml del TNF α (E) y células sincrónicas (B, C y F) al tiempo 0 (B) y a las 24 h sin tratar (D) y con 5 ng/ml del TNF α (F).

RESUMEN DE RESULTADOS y DISCUSIÓN

- La medición de la reducción del MTT resultó ser un método útil para detectar el estrés oxidativo causado por el $\text{TNF}\alpha$ en las células L929.
- Se asignó un valor numérico al estrés oxidativo a partir de los datos de reducción del MTT, el índice de estrés oxidativo.
- Este indicador correlaciona con la muerte de las células L929.
- La protección parcial contra el efecto citotóxico correlaciona con una disminución en el índice de estrés oxidativo.
- En contraste con los resultados obtenidos con MTT, el estrés oxidativo detectado tempranamente por oxidación del DCF no correlaciona con la citotoxicidad inducida por la citocina en estas células.
- Las células tratadas con el $\text{TNF}\alpha$ no terminan de duplicar su DNA y por lo tanto no ingresan a la fase G_2/M del ciclo celular.
- Los cultivos de L929 que se tratan con la citocina cuando se encuentran mayoritariamente en fase G_0/G_1 son sensibles al efecto citostático del $\text{TNF}\alpha$, lo que correlaciona con un índice de estrés oxidativo inferior a dos y protección frente a la muerte inducida por la citocina.

En conclusión:

Se identificó un umbral de estrés oxidativo a partir del cual ocurre la muerte de las células L929 que corresponde a un índice de estrés oxidativo igual a 2.

PERSPECTIVAS

- Dado que el hallazgo central de este trabajo se refiere a la correlación entre el valor que denominamos índice de estrés oxidativo y la muerte que induce el $\text{TNF}\alpha$, sería muy interesante extrapolar lo que ocurre en este sistema a otros sistemas en los que la muerte ocurre debido a otros factores y en los que también se encuentra presente el estrés oxidativo. Si se obtuvieran resultados similares, la medida bioquímica de estrés oxidativo que determinamos sería un parámetro útil en una gran variedad de sistemas de citotoxicidad en los que quizá la vía de señalización de las caspasas no esté involucrada o al menos no sea una vía central.
- Sería interesante corroborar que los tratamientos con las moléculas antioxidantes que protegen del efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ evitan el aumento en el índice de estrés oxidativo y por lo tanto se mantiene la correlación entre éste y la muerte.
- Para completar los estudios acerca de la relación entre el ciclo celular y la muerte causada por el $\text{TNF}\alpha$ es necesario realizar experimentos en los que se sincronicen las células L929 en otras fases del ciclo celular distintas de G_0/G_1 .
- También sería importante explorar la presencia y/o actividad de moléculas que pudieran estar involucradas en la muerte celular, pero también son reguladoras del ciclo celular como p53 y p21.

DISCUSIÓN GENERAL

1. ¿Cuál es la aportación central de este trabajo de tesis?

Entre los resultados que se presentan en esta tesis, algunos que ya reportamos y otros controversiales, cabe destacar la identificación de un umbral de estrés oxidativo que correlaciona con la muerte que induce el $\text{TNF}\alpha$. Este umbral a partir del cual el daño citotóxico es irreversible (lo que llamamos índice de estrés oxidativo mayor que 2), es un concepto que se presupone casi siempre pero que, hasta donde tenemos conocimiento, ningún grupo de investigación en el área ha caracterizado. El único reporte al respecto es el de nuestro grupo (Gómez, E. O. *et al.*, 1996) (ver anexo), en el que se exponen algunos de los resultados que se presentan en este trabajo.

La búsqueda y caracterización de un umbral de estrés oxidativo durante la muerte celular tiene importancia por lo que puede significar para la comprensión del proceso en toda su complejidad, es decir, porque se puede intentar responder a preguntas como las siguientes: ¿Es posible revertir el proceso, con un estrés oxidativo justo por encima del umbral, proporcionándole a la célula las condiciones necesarias para potenciar los mecanismos de reparación de macromoléculas?, ¿qué ocurre en la célula, en cuanto a defensas antioxidantes y/o mecanismos de reparación, alrededor del valor umbral? ¿Es entonces este umbral definitorio para la reversibilidad o no del proceso?

El umbral de estrés oxidativo que en nuestro sistema de estudio correlaciona con la muerte, se identificó de manera indirecta por reducción de una molécula que acepta electrones del radical superóxido. Estamos conscientes de que sería importante medir el estado redox de la célula como un parámetro más directo del estado de oxidación global.

También resultaría interesante estudiar en otros sistemas, tanto en diferentes tipos celulares como con varios efectores de muerte, si este umbral está presente, o si es de la misma magnitud que en nuestro modelo. Son posibles varios escenarios, quizá en algún caso ocurra que la magnitud del umbral no sea la misma y se puede pensar que la maquinaria de reparación celular se encuentra entonces en diferentes niveles de actividad. Mientras menor sea el umbral quizá la maquinaria de reparación sea más deficiente y viceversa.

2. ¿Tiene la molécula Bcl-2 un papel en este sistema?

Como una estrategia para determinar si la generación de especies reactivas de oxígeno -que causa el TNF α - tiene o no relación con la muerte celular, se decidió transfectar los fibroblastos L929 con el gen de la proteína Bcl-2. Bcl-2 y otros miembros de la misma familia son capaces de proteger de la muerte que causan diversos estímulos (Sato, N. *et al.*, 2002; Kim, Y. H. *et al.*, 2003), y existen reportes de que su efecto, al menos en algunos casos es antioxidante (Khar, A. *et al.*, 2003; Jang, J. H. y Surh, Y. J., 2003).

Se realizaron transfecciones con dos tipos de plásmidos. El plásmido pBabePuroBcl-2 tiene el gen de Bcl-2 bajo el control de un promotor constitutivo del virus de Moloney de la leucemia murina (Mo MuLV LTR), mientras que en el plásmido pLKNeoBcl-2 la expresión de Bcl-2 la controla un promotor inducible, el receptor de glucocorticoides activable por dexametasona (tabla 6).

La expresión constitutiva se examinó primero al transfectar células L929 tal como se obtuvieron de In Vitro, S. A. De este experimento se aislaron siete clones resistentes al antibiótico de selección (puromicina 8 μ g/ml).

Cuando se examinó la expresión de Bcl-2 por inmunoanálisis, en tres de las clonas no se detectó la proteína (fig. 25B).

Tabla 6. Resumen de clonas que se obtuvieron por transfección.

Clona	Adquisición de la resistencia	Plásmido	Expresión Basal	de Bcl-2 Inducida (Dex 10 μ M)	Resistencia al TNF α
A.2	Transfección de pool	PBabePuroBcl-2	-	N. A.	+++
A.3	"	"	-	N. A.	+++
A.4	"	"	+++	N. A.	++
A.5	"	"	-	N. A.	+++
B.1	"	"	++	N. A.	++
B.2	"	"	++	N. A.	++
C.2	"	"	+++	N. A.	++
D.1	Transfección de P6	"	-	N. A.	+++
D.3	"	"	+++	N. A.	++
D.5	"	"	-	N. A.	+++
E.1	"	pLKNeoBcl-2	+++	++++	++
E.2	"	"	+++	N. D.	++
E.4	"	"	-	N. D.	+
E.5	"	"	++	N. D.	+
E.6	"	"	-	++	-
E.7	"	"	-	N. D.	+
E.8	"	"	+	N. D.	++
E.9	"	"	-	N. D.	++
E.11	"	"	-	N. D.	++
E.12	"	"	-	N. D.	+++
E.13	"	"	-	+++	-
PR2	"	pBabepuro	N. D.	N. A.	-
F.5	"	pLKNeoBcl-2a	-	-	-

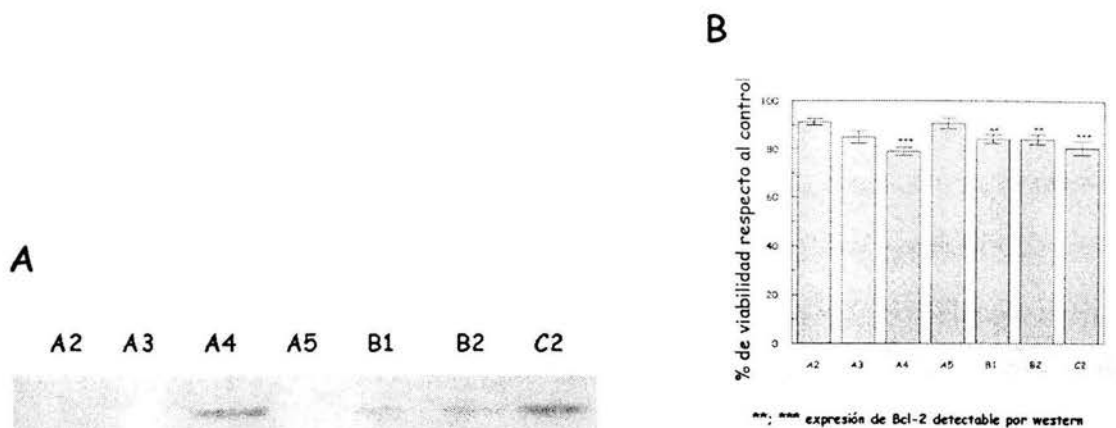


Figura 25. Expresión de la proteína Bcl-2 y efecto del $\text{TNF}\alpha$ en clonas que se transfectaron con pBabePuroBcl-2. A) Western-blot de extractos proteicos totales con un anticuerpo antiBcl-2. Las clonas se aislaron después de la transfección del pool de células L929 y la viabilidad de las mismas (B) se midió por cristal violeta después de 48 h de tratamiento con 5 ng/ml del $\text{TNF}\alpha$.

Todas estas clonas mostraron resistencia al $\text{TNF}\alpha$ aunque no expresaran la proteína de manera detectable (fig. 25A). Durante la selección con puromicina fue evidente que existe una gran variabilidad entre las células L929. De hecho, se sabe que es posible obtener clonas resistentes al $\text{TNF}\alpha$, si se parte de las células originales, simplemente por selección en presencia de la citocina.

Lo que esto significa es que las células que se aislaron como resistentes a puromicina, y a las que posteriormente se les comprobó su resistencia al $\text{TNF}\alpha$ (A2, A3, A4, A5, B1, B2 y C2) no provienen de células idénticas. En este momento no es posible saber el fenotipo de las células individuales que se transfectaron y lo más probable es que tuvieran distintos niveles de sensibilidad al factor. En consecuencia, por un lado es difícil determinar el efecto protector que se debe a Bcl-2 y por otro, la heterogeneidad inicial del cultivo puede explicar la resistencia de las clonas A2, A3 y A5.

A raíz de los resultados de esta transfección se decidió transfectar pBabePuroBcl-2 en la clona L929-P6; esta clona es sensible al antibiótico de selección (puromicina 3 $\mu\text{g/ml}$) y al $\text{TNF}\alpha$.

Se aislaron y caracterizaron tres clonas que se transfectaron con pBabePuroBcl-2 (D1, D3 y D5) y una que se transfectó con el vector vacío como control (PR2) (ver tabla 6).

Aunque las clonas D1 y D5 no parecen expresar la proteína (figura 26A), resultaron ser tan resistentes como la clona D3 (ver en resultados la figura 15B). En este caso las tres clonas provienen de la misma célula parental L929-P6 sensible al $\text{TNF}\alpha$, por lo que postulamos que en las clonas que no expresan Bcl-2 detectable por inmunoanálisis de alguna forma la transfección indujo la resistencia al $\text{TNF}\alpha$ y al estrés oxidativo que se genera por H_2O_2 .

La primera posibilidad que se examinó fue que si bien la expresión de Bcl-2 en las clonas D1 y D5 no fue detectable, quizá si se exprese por debajo de los niveles de detección. Por esta razón se decidió analizar la expresión del RNA mensajero de Bcl-2 en estas células; después de realizar transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se encontró que en las clonas D1 y D5 el mensajero de Bcl-2 es igual de abundante que en la parental (L929-P6) (fig. 25B).

El análisis de estos resultados se complicó aún más cuando se obtuvieron clonas que se transfectaron con el vector pBabePuro carente de inserto que resultaron ser resistentes también al $\text{TNF}\alpha$.

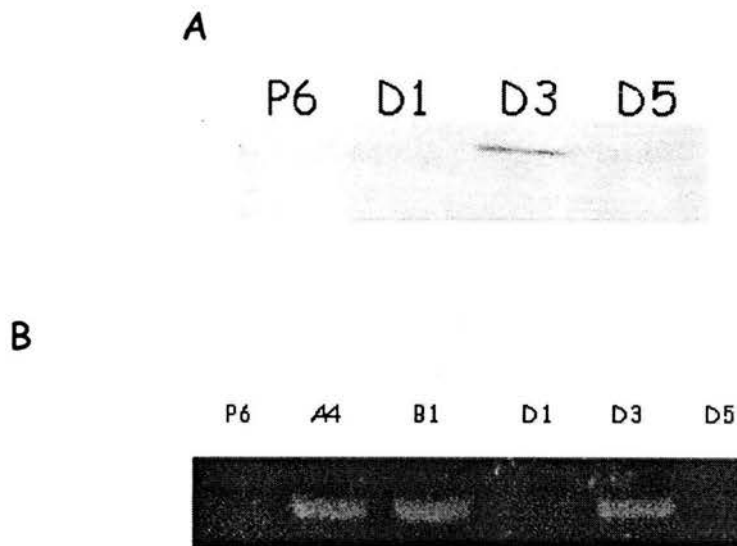


Figura 26. Detección del mensajero y la proteína Bcl-2. A) Western-blot con un anticuerpo antiBcl-2, B) Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos para el mensajero de Bcl-2.

Ya que Bcl-2 forma parte de una creciente familia de proteínas que agrupa tanto a proteínas capaces de bloquear la muerte, como a otras que la pueden acelerar (Borner, C., 2003) se decidió analizar por RT y PCR la posible expresión de otros miembros de la familia. De entre el grupo que protege de muerte se analizó también el mensajero de Bcl-x_L, encontrándose que en las tres clonas se sobreexpresa con respecto a la parental (figura 27A).

En general se piensa que el balance entre los dos tipos de proteínas, inhibitorias y promotoras de muerte, es importante para la supervivencia celular. Por esta razón era importante conocer los niveles de expresión de Bax, cuya sobreexpresión induce muerte celular (Xu, Z. W. et al., 2002). En todas las clonas que se analizaron, excepto la L929-P6, el RNAm de Bax presentó niveles similares y se observó una banda intensa después de 20 ciclos de amplificación (figura 27B). En conjunto, estos datos indican que las clonas

resistentes D1, D3 y D5, a diferencia de la clona L929-P6, presentan un balance favorable de Bcl-2/Bcl-x_L con respecto a Bax, lo cual puede explicar su fenotipo resistente al efecto citotóxico del TNF α .

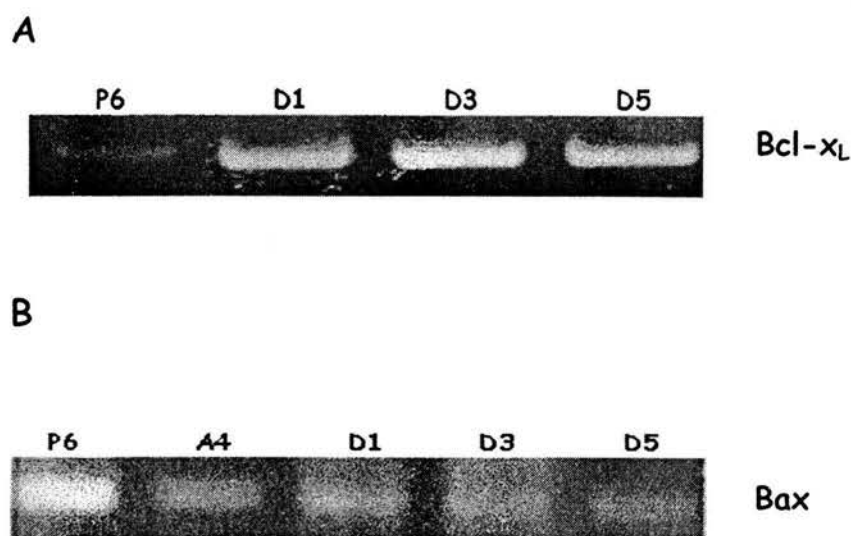


Figura 27. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa de los transcritos de A) Bcl-x_L y B) Bax.

Por supuesto, existen otras posibles explicaciones. Nuestra experiencia en el laboratorio es que el proceso de transfección por sí solo puede generar clones resistentes al TNF α . Al parecer, el estrés que sufren las células que sobreviven cuando se someten a la transfección es suficiente para que se activen defensas celulares que bien pudieran luego proteger a las células cuando se tratan con la citocina. Si bien no exploramos la estabilidad de la inserción, es posible que la movilidad del transgen o de otra secuencia del plásmido pudiera activar una maquinaria general de defensa que coincidiera con la maquinaria de protección contra el TNF α . En cualquier caso, la aparición de clones resistentes al efecto citotóxico del TNF α que no expresan Bcl-2 hace imposible asignar un papel protector a la sobreexpresión de esta proteína.

Aunque este punto es controversial, documenta un fenómeno recurrente pero casi sin estudiar: el efecto de la transfección, transitoria o estable, sobre diferentes aspectos de la fisiología celular. Nuestros hallazgos sugieren que al menos la susceptibilidad a la muerte por efectores específicos como el $\text{TNF}\alpha$ o por efectores inespecíficos como el H_2O_2 puede afectarse por este proceso.

3. L929 y el $\text{TNF}\alpha$: ¿necrosis o apoptosis?

El tipo de muerte que causa el $\text{TNF}\alpha$ en las células L929 también es motivo de controversia. Así como existen reportes en los que estas células presentan características de apoptosis al tratarse con la citocina, como la degradación internucleosomal del DNA (Mirкина, I. I. *et al.*, 1996) y la condensación de la cromatina (Fady, C. *et al.*, 1995), también se publicó que estos sucesos no se presentan (Humphreys, D. T. y Wilson, M. R., 1999). El punto de desacuerdo se profundiza ya que al acelerar la muerte por la adición del inhibidor de la transcripción Actinomicina-D, las características de este proceso son diferentes que con sólo el $\text{TNF}\alpha$.

Como resulta obvio desde el comienzo de esta discusión, es muy importante determinar las características particulares de las células L929 con que contamos en el laboratorio. Con este fin decidimos aclarar si ocurrían o no los cambios apoptóticos en particular en cuanto a los ácidos nucleicos. En conclusión, detectamos cambios de tipo apoptótico cuando las células se trataron simultáneamente con el $\text{TNF}\alpha$ y actinomicina-D pero fuimos incapaces de obtener evidencia de muerte apoptótica cuando el tratamiento fue únicamente con el $\text{TNF}\alpha$. Esto coincide con publicaciones recientes en las que queda claro que el $\text{TNF}\alpha$ sólo provoca en estas células un tipo de muerte necrótica que se caracteriza por daño inespecífico al DNA (Humphreys, D. T. y

Wilson, M. R., 1999), estrés oxidativo que se deriva del daño mitocondrial (Goossens, V. *et al.*, 1999a; Goossens, V. *et al.*, 1999b), disrupción de la membrana plasmática que puede evidenciarse por exposición de fosfatidilserina sobre la superficie celular (Humphreys, D. T. Y Wilson, M. R., 1999), activación de PARP-1 (Los, M. *et al.*, 2002) y sensibilización por inhibidores de caspasas como Ac-YVAD-cmk, zDEVD-fmk o zVAD-fmk (Vercammen, D. *et al.*, 1998), es decir, independiente de caspasas. Por otro lado, cuando se utiliza la citocina más la actinomicina-D, se observan características de muerte apoptótica en cuanto a cambios nucleares y el patrón de fragmentación de DNA (Humphreys, D. T. Y Wilson, M. R., 1999).

Resultados sin publicar del Biól. José Luis Ventura en nuestro laboratorio, al analizar el procesamiento de PARP-1 durante la muerte de los fibroblastos L929-P6 que se tratan con el TNF α , revelan que no se presentan los cortes característicos que median las caspasas.

La conclusión de nuestro grupo de trabajo, que coincide con la de la mayoría de los grupos del área, es que los fibroblastos L929 que se tratan con el TNF α mueren por un proceso necrótico y no apoptótico. Esto no quiere decir que se trate de un fenómeno menos interesante o como muchas veces se maneja de un proceso poco representativo de las condiciones fisiológicas. Actualmente las características de la muerte fisiológica e incluso de la muerte celular programada no se restringen a datos morfológicos estrictos y excluyentes de apoptosis. Existen múltiples reportes de sistemas en los que la muerte celular no puede catalogarse como apoptosis o necrosis, sino que muestran características mixtas e incluso algunas particulares. Esto lo que quiere decir es que cualquier modelo de muerte es mucho más complejo de lo que se pensó con anterioridad.

4. Muerte y ciclo celular

El reporte más antiguo con respecto a la relación entre la muerte de las células L929 que causa el $\text{TNF}\alpha$ y el ciclo celular, menciona que moléculas que bloquean la proliferación celular como el $\text{TGF}\beta$ protegen del efecto citotóxico (Belisario, J. E. y Dinarello, C. A., 1991). Nuestros datos, que obtuvimos de dos tipos de experimentos apuntan a conclusiones similares. Por un lado se encuentra la observación inicial durante el tratamiento con dexametasona para inducir el promotor sensible al glucocorticoide; la dexametasona a una concentración de $10\ \mu\text{M}$ inhibe la proliferación de las L929-P6 y experimentos posteriores de la QFB Criselda Mendoza-Milla demostraron que este tratamiento detiene a las células en la fase G_1 del ciclo celular. Este fenómeno correlacionó con la protección de la muerte que media el $\text{TNF}\alpha$.

El otro grupo de experimentos, los que se realizaron con células que se trató de sincronizar, hace pensar que las células L929-P6 no son sensibles al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ mientras permanezcan en la fase G_1 , probablemente en la porción más temprana de esta fase.

Sin embargo, debe quedar claro que una relación estrecha entre ciclo celular y muerte no es la única explicación posible. Tanto en el caso de la sincronización de las células como con el tratamiento con dexametasona existen alternativas en las que esta correlación no es más que una coincidencia.

Por ejemplo, la dexametaxona, además de su efecto sobre la proliferación celular, desencadena la expresión de diversos genes que participan en la protección frente a la muerte celular (Gascoyne, D. M. *et al.*, 2003). Ahora bien, en cuanto a la sincronización lo que podría ocurrir es que se trata de un proceso estresante que activa la expresión y/o función de moléculas que protegen entre otras cosas del estrés oxidativo. Al poner a las

Falta página

N° 107

En nuestro sistema, la enzima PARP-1 parece ser la responsable de la mayor parte del proceso de reparación, lo que lleva al consumo casi total del ATP. Al considerar que un inhibidor de la PARP-1, la 3-aminobenzamida, obviamente empeora la destrucción del DNA, pero disminuye la muerte celular, se sugiere que la reparación del DNA subsecuente al daño es un componente más importante en la citotoxicidad, que el daño oxidativo *per se* (Shoji, Y. *et al.*, 1995).

5. ¿Y entonces?

Con base en los datos que se obtuvieron durante el desarrollo de esta tesis, proponemos un modelo que trata de explicar de forma global la relación entre el estrés oxidativo que se genera por la activación de la vía de transducción del TNF α , los efectos sobre ciclo celular y la muerte sobre las células L929-P6. Uno de los hallazgos sobresalientes de este trabajo fue la identificación de un umbral de reducción de MTT a partir del cual se inicia la muerte que induce el TNF α .

La unión del trímero del TNF α a sus también triméricos receptores, que se encuentran en la membrana plasmática de las células L929, produce un aumento de especies reactivas de oxígeno (presumiblemente radicales hidroxilo) detectables desde la primera hora de tratamiento. Muy probablemente este estrés oxidativo inicial cause daño generalizado sobre las macromoléculas celulares, como el que detectamos sobre el DNA incluso con dosis muy baja de la citocina. Simultáneamente se encienden las vías de protección en las que participan las proteínas TRAF y NF- κ B (Chu, Z. L. *et al.*, 1997; Wang, C. Y. *et al.*, 1998) y en respuesta al daño oxidativo sobre el DNA se activa PARP-1 lo que desencadena las consecuencias que ya mencionamos.

Ahora bien, nosotros proponemos que la oxidación del DNA también provoca la expresión de proteínas cuya función es sensor el estado del DNA, como p53. El Biólogo José Luis Ventura, durante su tesis de maestría, demostró que en las células que se tratan con el $\text{TNF}\alpha$ se induce la expresión de esta proteína, lo cual puede nos hace pensar que puede ejercer sus funciones como punto de control durante la fase G_1 del ciclo celular. La idea es que el daño masivo al DNA, que probablemente corresponda en el tiempo, al estrés que podemos detectar con MTT y que seguramente significa también daño mitocondrial masivo, causa el aumento de p53 y esto tendría como consecuencia que las células se detuvieran en la fase G_1 de su ciclo. Esto no es posible observarlo en las células asincrónicas ya que seguramente el porcentaje de células que atraviesan el punto de control en G_1 que se regula por p53 es pequeño. Ahora bien, en las células sincrónicas es notable el efecto citostático que ocurre cuando se tratan con el $\text{TNF}\alpha$, sin embargo las células si entran en la fase S e incluso a las 24 h ya entraron a G_2/M . Al parecer en este caso puede funcionar un punto de control en G_2/M ya que a las 36 horas todavía no se dividen.

En nuestro modelo la mayoría de las células que se tratan con la citocina acceden a la fase S del ciclo celular, el daño al DNA requiere de la maquinaria de reparación (PARP-1, por ejemplo) y muchas de las moléculas necesarias para la replicación del DNA se reclutan para reparar el daño oxidativo a gran escala. En último término, la célula es incapaz de contender con esta doble necesidad y no puede completar la fase S, lo que nosotros observamos como un corrimiento hacia la izquierda del pico normalmente correspondiente a G_2/M .

Esto modelo explica también por qué todas las condiciones que provocan que las células se detengan en la fase G_1 , es decir, que no requieran de síntesis, se protegen del efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam-Klages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder, D., Bernardo, K. y Kronke, M. (1998) Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 678-682.
- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J. y Kronke, M. (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937-947.
- Aderka, D., Holtmann, H., Toker, L., Hahn, T. y Wallach, D. (1986) Tumor necrosis factor induction by Sendai virus. *J. Immunol.* **136**, 2938-2942.
- Aggarwal, B. B. (2000) Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, Supl. 1:6-16.
- Aggarwal, S., Drusdale, B. E. y Shin, H. S. (1988) Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involves ADP-ribosylation. *J. Immunol.* **140**, 4187-4192.
- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. y Hass, P. E. (1985) Characterization of receptor for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma interferon. *Nature* **318**, 665-667.
- Aggarwal, B. B., Khor, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V. y Harkins, R. N. (1985b) Human tumor necrosis factors: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 2345-2354.
- Akao, Y., Otsuki, Y. S., Kataoka, S., Ito, Y. y Tsujimoto, Y. (1994) Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum, and mitochondrial membrane. *Cancer Res.* **54**, 2468-2471.
- Akkaraju, G. R. y Basu, A. (2000) Overexpression of protein kinase C-eta attenuates caspase activation and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 103-107.
- Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T. y Hefeneider, S. (1990) Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 1015-1075.
- Ashkenazi, A. y Dixit, V. M. (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Baglioni, C., McCandless, S., Tavernier, J. y Fiers, W. (1985) Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J. Biol. Chem.* **260**, 13395-13397.

Faltan páginas

N° 111-120

- Molet, S., Gosset, P., Vanhee, D., Tillie-Leblond, I., Wallaert, B., Capron, M. y Tonnel, A.B. (1998) Modulation of cell adhesion molecules on human endothelial cells by eosinophil-derived mediators. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 351-358.
- Mohan, M. J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G. M., Becherer, J. D., Moss, M. L. y Milla, M. E. (2002) The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* **41**, 9462-9469.
- Monaghan, P., Robertson, D., Andrew, T., Amos, S., Dyer, M. J. S., Mason, D. Y. y Greaves, M. F. (1992) Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1819-1825.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Muller, U., Jongeneel, C. F., Nedoospasov, S. A., Lindahl, K. F. y Steinmetz, M. (1987) Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* **325**, 265-267.
- Nakajima, Y., DelliPizzi, A., Mallouh, C. y Ferreri, N. R. (1995) Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the growth of human prostate cancer cell lines. *Urol. Res.* **23**, 205-210.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D. J., Woodgett, J. R., Balsano, C. y Levrero, M. (1997) Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* **275**, 200-203.
- Nedwin, G. E., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Smith, D., Jarret, N. J., Pennica, D., Goeddel, D. V. y Gray, P. W. (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6361-6373.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. y Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell.* **2**, 389-395.
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. y Hannun, Y. A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.
- Oltvai, Z. N. y Korsmeyer, S. J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**, 189-192.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.

- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. y Donner D. B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.
- Pan, W., Zadina, J. E., Harlan, R. E., Weber, J T., Banks, W. A. y Kastin, A. J. (1997) Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 603-613.
- Park, Y. M., Han, M. Y., Blackburn R. V. y Lee, Y. J. (1998) Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF alpha-induced oxidative DNA damage biomarker, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in L929 cells. *J. Cell Physiol.* **174**, 27-34.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. y Kollias, G. (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397-1411.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H. y Kollias, G. (1997) Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6319-6323.
- Peters, P. M., Ortaldo, J. R., Shalaby, M. R., Svedersky, L. P., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Hass, P. E., Aggarwal, B.B., Herberman, R. B. y Goeddel, D. V. (1986) Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-alpha but not TNF-beta (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J. Immunol.* **137**, 2592-2598.
- Petruschke, T. y Hauner, H. (1993) Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 742-747.
- Pincus, T. y Callahan, L. F. (1995) New therapeutic approaches in autoimmune rheumatic diseases, with special emphasis on reumathoid arthritis. *Brit. J. Rheumatol.* **34**, 193-199.
- Pinsky, M. R. (1994) Clinical studies on cytokines in sepsis: role of serum cytokines in the development of multiple-systems organ failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9** (Suppl 4), 94-98.
- Pistoia, V. y Corcione, A. (1995) Relationships between B cell cytokine production in secondary lymphoid follicles and apoptosis of germinal center B lymphocytes. *Stem Cells* **13**, 487-500.
- Pollock, V. P., Lofthouse, E. J., Jupp, O. J., Gauld, S. B., Anderson, H. M. y MacEwan, D. J. (2000) Selective down-regulation of the G(q)alpha/G11alpha G-

protein family in tumour necrosis factor-alpha induced cell death. *Mol. Cell. Biochem.* **206**, 67-74.

Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G. y Wolf, G. (1997) 2, 7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* **416**, 175-178.

Qi, C. y Pecala, P. H. (2000) Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223**, 128-135.

Raines, M. A., Kolesnick, R. N. y Golde, D. W. (1993) Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 14572-14575.

Ranganathan, S. y Davidson, M. B. (1996) Effect of tumor necrosis factor-alpha on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabol.* **45**, 1089-1094.

Reid, M. B y Li, Y. P. (2001) Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* **2**, 269-272.

Romagnani, S. (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. All. Ast. Immunol.* **85**, 9-18.

Ross, S. A., Halliday, M. I., Campbell, G. C., Byrnes, D. P. y Rowlands, B. J. (1994) The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br. J. Neurosurg.* **8**, 419-425.

Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M. y Goeddel, D. V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**, 1424-1427.

Rothe, M., Xiong, J., Shu, H. B., Williamson, K., Goddard, A. y Goeddel, D. V. (1996) I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 8241-8246.

Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Van Parijs, L. y Lodis, H. F. (2002) Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expresión of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* **51**, 1319-1336.

Sandborn, W. J. (2001) Strategies targeting tumor necrosis factor in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol. Belg.* **64**, 170-172.

Sanford, K. K., Earle, W. R. y Likely, G. D. (1948) The Growth *in Vitro* of Single Isolated Tissue Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **9**, 229-246.

Sanford, K. K., Likely, G. y Earle, W. R. (1956) The Tumor-producing Capacity of Strain L Mouse Cells after 10 Years *in Vitro*. *Cancer Res.* **16**, 162-166.

Sato, N., Sakuma, C., Kato, H., Milligan, C. E., Oppenheim, R. W. y Yaginuma, H. (2002) Bcl-2 rescues motoneurons from early cell death in the cervical spinal cord of the chicken embryo. *J. Neurobiol.* **53**, 381-390.

- Satomi, N., Sakurai, A., Haranaka, R. y Haranaka, K. (1988) Preventive effects of several chemicals against lethality of recombinant human tumor necrosis factor. *J. Biol. Response Mod.* **7**, 54-63.
- Schulze-Osthoff, K., Baeyaert, R., Vandevoorde, V., Haegerman, G. y Fiers, W. (1993) Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inducible effects of TNF. *EMBO J.* **12**, 3095-3104.
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, B., Baeyaert, R., Jacob, W. A. y Fiers, W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. *J. Biol. Chem.* **267**, 5317-5323.
- Seitz, C., Mannel, D. N. y Hehlhans, T. (1998) Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter. *Genomics* **48**, 111-116.
- Shakov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A. y Jongeneel, C. V. (1990) Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.* **171**, 35-47.
- Shanahan, W. R. Jr, Hancock, W. W. y Korn, J. H. (1989) Expression of IL-1 and tumor necrosis factor by endothelial cells: role in stimulating fibroblast PGE2 synthesis. *J. Exp. Pathol.* **4**, 17-27.
- Shinmei, M., Masuda, K., Kikuchi, T., Shimomura, Y. y Okada, Y. (1991) Production of cytokines by chondrocytes and its role in proteoglycan degradation. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 89-91.
- Shoji, Y., Uedono, Y., Ishikura, H., Takeyama, N. y Tanaka, T. (1995) DNA damage induced by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. *Immunology* **84**, 543-548.
- Shütze, S., Scheurich, P., Schlüter, C., Ucer, U., Pfizenmaier, K. y Krönke, M. (1988) Tumor necrosis factor-induced changes of gene expression in U937 cells. *J. Immunol.* **140**, 3000-3005.
- Slater, T. F. Sawyer, B. y Straeuli, U. (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 383-393.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D. y Goodwin, R. G. (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**, 1019-1023.
- Smith, C. A., Farrar, T. y Goodwin, R. G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962.

- Smith, R. A. y Baglioni, C. (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* **262**, 6951-6954.
- Smith, R. A. y Baglioni, C. (1989) Multimeric structure of the tumor necrosis factor receptor of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 14646-14652.
- Soranzo, C., Perego, P. y Zunino, F. (1990) Effect of tumor necrosis factor on human tumor cell lines sensitive and resistant to cytotoxic drugs, and its interaction with chemotherapeutic agents. *Anticancer Drugs* **1**, 157-163.
- Spies, T., Blanck, G., Bresnahan, M., Sands, J. y Strominger, J. L. (1989) A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* **243**, 214-217.
- Spriggs, D. F., Deutsch, S. y Kufe, D. W. (1992) Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol. Ser.* **56**, 3-34.
- Srivastava, M. D., Srivastava, A., Brouhard, B., Saneto, R., Groh-Wargo, S. y Kubit, J. (1996) Cytokines in human milk. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **93**, 263-287.
- Suffys, P., Beyaert, R., van Roy, F. y Fiers, W. (1987) Reduced tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 735-743.
- Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A. Jr y Shepard, H. M. (1985) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**, 943-945.
- Sweet, M. J. y Hume, D. A. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leuk. Biol.* **60**, 8-26.
- Tammariello, S. P., Quinn, M. T. y Estus, S. (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **20**, RC53.
- Tang, P., Hung, M. y Klostergaard, J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* **35**, 8216-8225.
- Tcherkasowa, A. E., Adam-Klages, S., Kruse, M. L., Wiegmann, K., Mathieu, S., Kolanus, W., Kronke, M. y Adam, D. (2002) Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J. Immunol.* **169**, 5161-5170.
- Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J. 3d, Zentella, A., Albert, J. D., Shires, G. T. y Cerami, A. (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470-474.

- Torti, S. V., Kwak, E. L., Miller, S. C., Miller, L. L., Ringold, G. M., Myambo, K. B., Young, A. P., y Torti, F. (1988) The molecular cloning and characterization of a murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor inducible gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 12638-12644.
- Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F. y Cerami, A. (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* **330**, 662-664.
- Trent, J. C. 2nd, McConkey, D. J., Loughlin, S. M., Harbison, M. T., Fernandez, A. y Ananthaswamy, H. N. (1996) Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *EMBO J.* **15**, 4497-4505.
- Tsujimoto, M., Yip, Y. K. y Vilcek, J. (1985) Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7626-7630.
- Uslu, R. y Bonavida, B. (1996) Involvement of the mitochondrion respiratory chain in the synergy achieved by treatment of human ovarian carcinoma cell lines with both tumor necrosis factor-alpha and cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer* **77**, 725-732.
- Valen, G., Erl, W., Eriksson, P., Wuttge, D., Paulsson, G. y Hansson, G.K. (1999) Hydrogen peroxide induces mRNA for tumour necrosis factor alpha in human endothelial cells. *Free Radic. Res.* **31**, 503-512.
- Van Antwerp, D. J., Martín, S. J., Kafri, T., Green, D. R. y Verma, I. M. (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**, 787-789.
- Van Dervort, A. L., Yan, L., Madara, P. J., Cobb, J. P., Wesley, R. A., Corriveau, C. C., Tropea, M. M. y Danner, R. L. (1994) Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils. *J. Immunol.* **152**, 4102-4109.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. y Wallach, D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* **9**, 267-276.
- Vaux, D. L., Haeccker, G. y Strasser, A. (1994) An Evolutionary Perspective on Apoptosis. *Cell* **76**, 777-779.
- Venable, M. E., Blobbe, G. C. y Obeid, L. M. (1994) Identification of a defect in the phospholipase D/diacylglycerol pathway in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **269**, 26040-26044.

- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W. y Vandenabeele, P. (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **187**, 1477-1485.
- Vistica, D. *et al.* (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515-2520.
- Vitkovic, L., Bockaert, J. y Jacque, C. (2000) « Inflammatory » cytokines. neuromodulators in normal brain? *J. Neurochem.* **74**, 457-471.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. y Baldwin Jr., A. S. (1998) NF- κ B Antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683.
- Wang, Y., Wang, J., Yonglian, S., Wu, Q. y Fu, Y-X. (2001) Complementary effects of TNF and lymphotoxin on the formation of germinal center and follicular dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 330-337.
- Wang, Y., Wu, T. R., Cai, S., Welte, T. y Chin, Y. E. (2000) Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4505-4512.
- Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., Sone, H., Yamauchi, N., Maeda, M. y Urushizaki, L. (1988) Cytocidal mechanism of TNF: effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **10**, 109-116.
- Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., Sone, H., Yamauchi, N., Umetsu, T. y Urushizaki, I. (1985) Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**, 1115-1119.
- Watts, A. D., Hunt, N. H., Wanigasekara, Y., Bloomfield, G., Wallach, D., Roufogalis, B. D. y Chaudhri, G. (1999) A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* **18**, 2119-2126.
- Webb, B. L., Hirst, S. J., Giembycz, M. A. (2000) Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol.* **130**, 1433-1452.
- Wong, G. H. y Goeddel, D. V. (1986) Tumor necrosis factor α y β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **323**, 819-822.
- Wong, G. H. W. y Goeddel, D. F. (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**, 941-944.

Wong, G. H. W., Elwell, J. H., Oberley, L. W. y Goeddel, D. V. (1989) Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**, 923-931.

Yamauchi, N., Kuriyama, Y. H., Watanabe, N., Neda, H., Maida, M., Himeno, T. y Tsuji, Y. (1989) Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res.* **49**, 1671-1675.

Xu, Z. W., Friess, H., Buchler, M. W. y Solioz, M. (2002) Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 504-510.

You, Z., Ouyang, H., Lopatin, D., Polver, P. J. y Wang, C. Y. (2001) Nuclear factor-kappa B-inducible death effector domain-containing protein suppresses tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting caspase-8 activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 26398-26404.

Zentella, A., Manogue, K. y Cerami, A. (1993) Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine* **5**, 436-447.

Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A. y Abu-Amer, Y. (2001) Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 563-568.

Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B. y Andrews, D. W. (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* **15**, 4130-4141.

Zimmerman, R. J., Chan, A. y Leadon, S. A. (1989) Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **49**, 1644-1648.

Zimmerman, R. J., Marafino, B. J., Jr., Chan, A., Landre, P. y Winkelhake, J. L. (1989) The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo: implications for mechanism of action. *J. Immunol.* **142**, 1405-1409.