



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Instituto de Fisiología Celular**

**Resultado del contexto de citocinas co-secretadas  
con TNF- $\alpha$  en la activación de células endoteliales**

Potenciación de la traslocación de NF $\kappa$ B y la capacidad de adhesión

Tesis que para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas presenta

**Lucia Nikolaia López Bojórquez**

**Director de Tesis. Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

México D.F. Octubre 2004



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.

## RESUMEN

La activación exacerbada del sistema inmune puede llevar a condiciones patológicas tales como el choque séptico o la inflamación crónica. En el desarrollo de estos procesos, la activación endotelial en respuesta a factores inflamatorios (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) secretados por macrófagos activados juega un papel fundamental. En este trabajo, examinamos la respuesta de cultivos primarios de células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVECs) a Medios Condicionados (MC) obtenidos de macrófagos activados *in vitro* con lipopolisacárido bacteriano (LPS). Nuestros resultados indican que los MC inducen un aumento significativo en la capacidad endotelial para adherir células en la capacidad de traslocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La traslocación de NF- $\kappa$ B dependiente de los MC resultó ser mayor y se sostuvo por más tiempo que la obtenida con TNF- $\alpha$ . Esta respuesta resultó ser totalmente dependiente del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$  presentes en forma natural en los MC. Sin embargo, tanto la traslocación de NF- $\kappa$ B como la capacidad de adhesión pasan por encima del nivel de saturación obtenidas con cualquiera de las dos citocinas recombinantes, añadidas por separado o en forma simultánea. Con el propósito de explicar este fenómeno, caracterizamos las tasas de degradación de las distintas isoformas de los inhibidores I $\kappa$ Bs encontrando que los MC inducen una degradación más rápida de  $\kappa$ B- $\beta$  e I $\kappa$ B- $\epsilon$  comparado con lo que ocurre tras la estimulación con TNF- $\alpha$ . Este resultado sugiere que el contexto de factores co-secretados con el TNF- $\alpha$ , por macrófagos activados con LPS, potencia la activación endotelial mediada por el TNF- $\alpha$  a través de la vía de NF- $\kappa$ B. Se discute la posible participación de este fenómeno en patologías inflamatorias.

**Palabras clave:** Inmunidad innata, Inflamación, citocinas inflamatorias, medios condicionados, HUVEC.

## ABSTRACT

Over-expression of the immune response can lead to pathological conditions such as septic shock or chronic inflammation. Endothelial cell activation by pro-inflammatory products of activated macrophages plays a key role in these conditions. Here we examine the response of primary human endothelial cells (HUVEC) to conditioned media (CM) obtained from LPS-activated macrophages. We show that, as expected, CM induced NF- $\kappa$ B translocation, as well as adhesion capacity in HUVEC. We further show that this response is critically dependent on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  naturally present in the CM. However, both the amplitude of NF- $\kappa$ B translocation and adhesiveness observed with CM were well beyond the saturation levels attained after the sole stimulation with recombinant TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , either separately or together. We further characterized the translocation of NF- $\kappa$ B in the presence of CM by studying the degradation rate of individual I $\kappa$ B isoforms. Our results show that CM induced a faster degradation of the I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$  isoforms than the recombinant cytokines, leading to an enhanced recruitment of NF- $\kappa$ B activity. The above results suggest that the physiological context of factors co-secreted by LPS-activated macrophages enhances TNF- $\alpha$  mediated endothelial activation. The role of CM potentiation in the over-response of the immune system during acute inflammatory diseases is discussed.

**Keywords:** Innate immunity, Inflammation, LPS-activated macrophage inflammatory products, Conditioned Media, HUVEC



## Gracias

A mis maestros, tutores y ejemplo: Julieta Rubio, Lino Díaz, Alicia González, Carmen Aceves, Carlos Valverde, Ricardo Rosales, Tere Tussie, Alejandro Zentella.

A quienes asistieron con entusiasmo y sin ventaja a la realización de este trabajo: Criselda Mendoza, Adriana Estrada, Delina Sánchez, José Luis Ventura, Fabián Arechavaleta, Macaria Matus, Rocío Camarillo.

A la Unidad de Computo y la de Biología Molecular del IFC: Laura Ongay, Lupita Codiz, Juan Barbosa.

Al personal de la Unidad Toco-quirúrgica, al departamento de Genética y al de Enseñanza del Hospital de la Mujer.

A mi Comité Tutoral: Yvonne Rosenstein, Felix Recillas, Edgar Zenteno.

Y a Gustavo Reyes y Enrique Ortega que generosamente me orientaron en el camino.

A todos los que leyeron (y re-leyeron) el artículo y ayudaron a construirlo: Humberto Gutiérrez, Enrique Espinosa, Carlos Valverde, Christopher Ormsby, Araxi Urrutia, y Michael Jerzizky.

A los que con cuidado buscaron en la tesis fallos, borriones y comas mal puestas: Jorge Aguilar y Nicolás López.

AL CONACYT (124917) PAEP (102342 y 202347) y DGEP, por hacer lo que les toca, supongo.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

La biología del endotelio vascular	3
La adhesión heterotípica célula-célula	6
Moléculas de adhesión y su expresión en el endotelio activado	7
Selectina-E	8
VCAM-1	9
ICAM-1	10
Selectina-P	10
El Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$	11
Un factor proteico mediador de necrosis hemorrágica en tumores	11
Un factor proteico inductor de caquexia	12
TNF- $\alpha$ : Mediador de patologías diversas	14
Macrófagos: células versátiles	16
Diferenciación mieloide	17
Activación mieloide	19
Los receptores Toll	20
Producción de secreción de macrófagos activados	21
¿La actividad de TNF- $\alpha$ y de IL-1 $\beta$ son superlapables?	23
interleucina 1-beta	24
interleucina-6	25
El factor de transcripción NF- $\kappa$ B	25
La activación de NF- $\kappa$ B mediada por citocinas inflamatorias	28
Muchos caminos llevan a NF- $\kappa$ B	29
La familia de proteínas I $\kappa$ B	31
I $\kappa$ B- $\alpha$	32
I $\kappa$ B- $\beta$	33
I $\kappa$ B- $\epsilon$	33
JUSTIFICACIÓN	36
ALFÓTESIS	36
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Cultivos celulares	37
Obtención de medios condicionados de macrófagos activados por endotoxina	38
ELISA	
Geles de acrilamida denaturalizantes para proteína (SDS-PAGE)	38
Tinción con Plata	39
Ensayo de citotoxicidad	39

Ensayo de Adhesión	40
Potenciación de Extractos Nucleares y Citoplásmicos	41
Fosforilación de oligonucleótidos	42
Geles de Acrilamida denaturalizantes para DNA	43
Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforetica	43
Electrotransferencia y ensayo de <i>Western Blot</i>	44
Análisis estadístico	44

## RESULTADOS

La respuesta de las células endoteliales a citocinas inflamatorias recombinantes	45
<i>La adhesión alcanza saturación a 1ng/ml de TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math></i>	46
<i>La activación endotelial deriva de la traslocación de NF-<math>\kappa</math>B al núcleo</i>	47
El protocolo de diferenciación y activación in vitro de un promieloma humano	48
Los Medios Condicionados inducen un aumento en la capacidad de adhesión y en la traslocación de NF- $\kappa$ B, por encima de la saturación obtenida con citocinas recombinantes	51
<i>El LPS remanente en los MC no es el responsable del efecto de potenciación observado</i>	52
<i>Anticuerpos neutralizantes dirigidos contra TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math> no abaten por completo la actividad de los MC</i>	52
<i>La traslocación de NF-<math>\kappa</math>B inducida por MC se sostiene durante mas tiempo que la inducida por TNF-<math>\alpha</math>.</i>	53
<i>En respuesta a MC se traslocan al núcleo las mismas subunidades de NF-<math>\kappa</math>B que en respuesta a TNF-<math>\alpha</math></i>	54
<i>La combinación de citocinas inflamatorias recombinantes no es capaz de reproducir el efecto de los MC.</i>	55
Los Medios Condicionados reclutan una poza alternativa de NF- $\kappa$ B	56
<i>El inhibidor BAY-117085 bloquea por completo la vía activada por los MC</i>	56
<i>La estimulación con MC induce una degradación mas rápida de las distintas isoformas de I<math>\kappa</math>B</i>	57

## DISCUSIÓN

Por qué el modelo de medios condicionados?	60
Las U937 son diferenciables in vitro hacia el linaje mielóide	62
Podemos visualizar el contexto de factores co-secretados con TNF- $\alpha$	63
La activación endotelial mediada por citocinas inflamatorias camina por vías bien documentadas	65
El patrón de complejos de NF- $\kappa$ B traslocado por TNF- $\alpha$ y por IL-1 $\beta$ , no es el mismo.	67

¿Qué quiere decir que las citocinas recombinantes saturan la adhesión y la traslocación de NF- $\kappa$ B?	68
El IFN- $\gamma$ reproduce la respuesta pero no está presente en los MC	69
Los Medios Condicionados inducen una activación cuantitativamente mayor y cualitativamente igual a la inducida por TNF- $\alpha$ recombinante.	70
La respuesta inducida por MC depende completamente de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	70
Los Medios Condicionados reclutan una poza adicional de NF- $\kappa$ B	71
¿La fuente de esta poza adicional de NF- $\kappa$ B son las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B- $\beta$ e I $\kappa$ B- $\epsilon$ ?	71
El TNF- $\alpha$ no es el único mediador de la respuesta inflamatoria	73
Modelos <i>in vitro</i> Vs. modelos <i>in vivo</i>	74
Consecuencias <i>in vivo</i> de la amplificación del fenómeno inflamatorio	75
<b>REFERENCIAS</b>	77

**Anexo 1** Artículo de Revisión: Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of septic shock. López-Bojorquez, et al,

**Anexo 2** Artículo de revisión: El factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en la respuesta inflamatoria López-Bojorquez

**Anexo 3** Artículo de revisión: Papel de las isoformas I $\kappa$ B en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. López-Bojorquez

**Anexo 4** Artículo: NF- $\kappa$ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Lopez-Bojorquez, et al,

Abreviaturas y glosario

# INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está constituido por un conjunto de mecanismos de respuestas innatas de carácter inherente e inespecífico que preceden a otras adquiridas y específicas. Las células del sistema inmune que ejercen estas respuestas siguen, desde etapas embrionarias, rigurosos procesos de selección y maduración funcional. De esta manera en un organismo adulto, tanto las respuestas innatas como las adquiridas operan con niveles muy finos de control y desempeño. La **respuesta inmune innata** constituye el primer frente de ataque ante embates externos y usualmente se presenta como **respuesta inflamatoria**. A manera de resumen se expondré a continuación una visión amplia de este fenómeno.

Durante la inflamación ocurre un reclutamiento local, masivo y específico de células del sistema inmune hacia la zona dañada. Este evento es disparado por estímulos locales emitidos por macrófagos activados y generalmente van acompañados de señales quimiotácticas liberadas por el propio tejido afectado. Los macrófagos pueden activarse por procesos infecciosos o de reparación tisular, resultando con ello en la secreción masiva de productos pro-inflamatorios. Estos son los responsables directos del reclutamiento de las células que participan en la respuesta inflamatoria (generalmente neutrófilos) hacia el sitio de daño con lo que se facilita la diapedesis, es decir, la infiltración celular desde el torrente sanguíneo hasta el parénquima. Para que ocurra la infiltración se requiere de la adhesión de las células circulantes a la pared vascular de las venas postcapilares que circundan el tejido dañado (1), lo cual implica una interacción directa entre las células circulantes (linfocitos, monocitos, neutrófilos) y la monocapa endotelial. Esta interacción directa demanda el reconocimiento específico y la unión mediante moléculas expresadas en la membrana de ambos tipos celulares.

La célula endotelial constituye, en condiciones normales, una superficie no trombogénica y no adherente. Sin embargo la adhesión implica un cambio fenotípico de la célula endotelial, de un estado de reposo a un estado activado y se caracteriza por la expresión de genes como quimiocinas (como RANTES e IL-8 que

participan en quimiotaxis), **citocinas inflamatorias** encargadas de amplificar la respuesta de activación (como la IL-6) y **moléculas de adhesión** que interactúan directamente con ligandos membranales de las células blanco; tal es el caso de Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. Esta **activación endotelial** le permite a la célula participar activamente en el desarrollo de la reacción inflamatoria se llama. Además de la expresión de la expresión de una gran variedad de moléculas de adhesión en la membrana apical, ocurren además profundos cambios en el citoesqueleto y las estructuras de transporte celular interno, así como el desmantelamiento de las uniones intercelulares entre células endoteliales y la formación de uniones transitorias con los leucocitos en proceso de extravasación. Todas estas modificaciones requieren de la transcripción concertada de un gran número de genes se transcriben en respuesta a los estímulos extracelulares que ocasionan en su conjunto la infiltración celular.

Prácticamente todos los genes cuya expresión se enciende durante la activación endotelial están regulados a nivel genético por el factor de transcripción **NF- $\kappa$ B**. Este factor tiene la particularidad de localizarse en el citoplasma, secuestrado por una familia de proteínas denominadas Inhibidoras del factor nuclear  $\kappa$ B (**I $\kappa$ B**). Los estímulos activadores de NF- $\kappa$ B inducen una cascada de transducción de señales que culmina con la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma de los I $\kappa$ Bs. Así el factor se trasloca desde el citoplasma al núcleo y se une a secuencias específicas en la cromatina (sitios de respuesta) delimitadas en la región promotora de muchos de los genes que caracterizan el fenotipo endotelial activado, permitiendo con ello su transcripción y subsecuente expresión.

Los macrófagos activados por microorganismos liberan productos que inician la respuesta inflamatoria que incluyen citocinas inflamatorias, en particular el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (**TNF- $\alpha$** ) y la Interleucina 1-beta (**IL-1 $\beta$** ). La activación endotelial mediada tanto por TNF- $\alpha$  como por IL-1 $\beta$  ha sido caracterizada con detalle. Ambas citocinas se unen a receptores membranales independientes que inducen vías de transducción que conllevan a la expresión específica de genes.

Los macrófagos activados por moléculas bacterianas específicas, como el Lipopolisacárido (**LPS**) o endotoxina, se encargan de secretar el conjunto de

factores que inician la cascada inflamatoria (citocinas, quimiocinas, enzimas de remodelación tisular, hormonas, proteínas transportadoras, etc). A pesar de que la mayoría de las citocinas inflamatorias fueron purificadas originalmente a partir de medios condicionados de macrófagos activados por endotoxina se desconoce en gran medida la composición exacta del conjunto de factores que los macrófagos activados por un antígeno bacteriano secretan al medio

La magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial: una respuesta insuficiente deriva en inmunodeficiencia, que abre la puerta a infecciones y cáncer; una respuesta excesiva puede producir daño tisular importante que se asocia a morbilidad como ocurre en patologías como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, arteriosclerosis, diabetes, Alzheimer, esclerosis múltiple, e isquemia cerebral y miocardial. Incluso puede llevar a la muerte. Si la respuesta inflamatoria se extiende a la circulación sistémica puede devenir en choque séptico, meningitis y trauma severo. Entonces la respuesta inflamatoria puede en ocasiones convertirse en un peligro mayor que el agente que la originó.

## La biología del endotelio vascular

Aunque la célula endotelial fue considerada durante muchos años como una monocapa inerte y no reactiva, el día de hoy se sabe que juega un papel fundamental en la homeostasis del sistema vascular y del sistema inmune. Su localización estratégica entre el torrente sanguíneo y los tejidos las convierte en moduladoras activas del intenso tráfico molecular y celular que ocurre entre ambos compartimentos. Por otro lado, la ubica como blanco primario de las señales de comunicación que son liberadas a la circulación (2).

La célula endotelial descansa sobre una membrana basal compuesta en su mayoría por colágena IV, elastina, laminina y fibronectina y juega un papel importante en el mantenimiento de esta matriz sintetizando un número importante de estos componentes protéicos (3). Estudios *in vitro* han demostrado que la fibronectina y la trombospondina llegan a componer alrededor del 15 % de los productos secretados al medio por parte de la célula endotelial. Las células

endoteliales producen también colágenas tipo I, III, IV y V e incluso participan en la remodelación de la membrana basal, produciendo colagenasas específicas (4).

La membrana apical de la célula endotelial es intrínsecamente no trombogénica y las plaquetas no estimuladas son incapaces de adherirse *in vivo* a la superficie endotelial intacta. Distintos reguladores pueden, sin embargo, dirigir el metabolismo endotelial de manera que participe en procesos tanto coagulantes como anticoagulantes (5). La adhesión de plaquetas al endotelio es dependiente del factor von Willebrand. Esta molécula se sintetiza como un precursor inactivo de 250 kDa y después de distintos pasos de agregación y proteólisis se secreta en forma regulada como un multímero de alto peso molecular que forma un soporte para la adhesión plaquetaria (6). Este factor es por otro lado uno de los marcadores endoteliales más empleados. La célula endotelial produce también el factor V de la coagulación y es capaz de unir a los factores IX<sub>a</sub> y X<sub>a</sub> de la coagulación, lo que probablemente ayuda a localizar este proceso (7) (8).

El transporte de ácidos grasos, triglicéridos, diacilglicerol y de Fe<sup>2+</sup> unido a transferrina hacia los tejidos también involucra activamente a la monocapa endotelial. Para ello las células endoteliales poseen receptores para β-LDL, HDL, acil-LDL y receptores a transferrina logrando así internalizar tales moléculas y modificar estas estructuras en intermediarios más rápidamente metabolizables (9). Como el resto de las células somáticas, las células endoteliales tienen receptores específicos a insulina y de hecho el endotelio arterial es capaz de unir dos veces más insulina que el endotelio venoso. Adicionalmente se ha observado que el efecto proliferativo de esta hormona también es distinto dependiendo del tipo endotelial blanco: en microvasculatura induce incorporación de timidina al DNA pero no en macrovasculatura (2).

De todos los procesos en los que el endotelio participa, probablemente el mejor caracterizado es la activación endotelial mediada por estímulos inflamatorios (10).

En estado quiescente las células endoteliales forman una monocapa que presenta un alto grado de heterogeneidad dependiendo del calibre del vaso y de su origen vascular o linfático. Sin embargo, en respuesta a los estímulos activadores, prácticamente todos los subtipos de célula endotelial presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan al estado activado.



Si bien la activación endotelial se caracteriza por cambios en el patrón de la expresión génica convenientes para adaptar a la célula a requerimientos locales, funcionales y específicos, esto no implica un proceso de diferenciación como tal ya que todos los cambios son reversibles (11, 12).

Las moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de la célula permiten dirigir a las células circulantes al sitio de daño lo cual constituye uno de los primeros pasos en la cascada inflamatoria. La expresión de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) participa en la modulación del tono vascular que se ve afectado durante la activación, disminuyendo localmente la presión sanguínea (13). Durante el choque séptico el óxido nítrico (ON) producido por la célula endotelial coopera en la patogénesis y la depresión de la función contráctil del miocardio (14).

Un fenómeno interesante que ocurre durante la activación endotelial es la síntesis y secreción por parte del endotelio de citocinas inflamatorias (TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) que actúan tanto de modo autócrino, como parácrino (15). Esto permite la ~~amplificación~~ y la ~~difusión~~ de la respuesta. La célula endotelial produce también factores de diferenciación y proliferación hematopoiética como G-CSF, y quimiocinas como la IL-8 (16) (17).

Las quimiocinas también forman parte del repertorio endotelial y permiten una respuesta quimiotáctica localizada como parte de la inmunidad innata. Incluyen miembros de las familias C-X-C (IL-8, IP-10, gro $\alpha$ ) y C-C (MCP-1, MCP-3, RANTES)(18). Estas últimas pueden participar también durante la migración de células endoteliales que ocurre en la angiogénesis (19).

Una característica importante que presenta la monocapa endotelial *in vivo*, es que funciona como un *sincicio*. La activación endotelial reordena las uniones homotípicas, permitiendo con ello un mayor grado de comunicación y de difusión de las señales locales y facilitando la transvasación celular (20). Entre las distintas proteínas membranales que sufren reorganización durante la activación endotelial, están las que participan en las uniones adherentes como VE-cadherina y  $\alpha$ , $\beta$ -cateninas (21).

La activación endotelial involucra también cambios significativos en el arreglo del citoesqueleto que capacitan a la célula para la transmigración leucocítica que sigue a la adhesión. Estudios inmunocitoquímicos señalan

rearrreglos en la organización de los filamentos de actina, especialmente aquellos asociados a las uniones célula-célula (22)

También se ve alterado el tráfico vesicular y muchas de las moléculas que antes de la activación que permanecían encapsuladas en vesículas asociadas a clatrina, que como el factor von Willebrand, son procesadas y liberadas al espacio extracelular (23).

Cabe resaltar entonces que a pesar de que las células endoteliales no forman parte del sistema inmune, su activación ocurre de manera coordinada con cambios en las poblaciones de macrófagos residentes y de leucocitos circulantes para hacer posible la reacción inflamatoria.

### ***La adhesión heterotípica célula-célula***

Como parte de la respuesta inflamatoria, el reclutamiento de las células circulantes inicia con su adhesión a la pared vascular.

Las moléculas de adhesión llamadas selectinas (E y P) están involucradas en las fases tempranas de la adhesión. Es una observación ya clásica que en las zonas donde comienza la inflamación, los linfocitos se mueven hacia la pared vascular y comienzan a rodar sobre ella. Este rodamiento o adhesión laxa es mediado precisamente por selectinas (24). Durante este proceso de rodamiento, en el que una célula se mueve muy rápidamente con respecto a la otra que se encuentra fija, el número de interacciones es más importante que la afinidad absoluta de los receptores celulares. Por otro lado, esta molécula presenta enorme flexibilidad, debida en parte a las múltiples repeticiones de regiones conservadas y la enorme presencia de carbohidratos (25).

La adhesión firme que ocurre después del rodamiento está mediada por receptores de integrinas (ICAM-1 y VCAM-1)(26). Estos pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas; poseen distintas repeticiones de dominios *Ig-like*, generalmente codificados por exones separados. La participación de estas moléculas está muy bien documentada en la migración celular que ocurre durante el desarrollo (1). Sin embargo, su papel en el fenómeno inflamatorio ha quedado claro en los últimos años, en particular por su abundante expresión en la pared vascular observada *in vivo* (27).



## Selectina-E

Pertenece a la súper familia de inmunoglobulinas. Se ha estudiado *in vivo* su abundante expresión en sitios de inflamación, en particular en patologías inflamatorias donde se observa una acentuada transmigración de neutrófilos (31). A partir de su secuencia de aa, se puede inferir un peso molecular de 64.5 KDa, sin embargo, en geles de SDS-PAGE pueden resolverse isoformas de 105 a 117 KDa lo que habla de distintos estados de glicosilación. Es una de las moléculas de superficie que se utilizan como marcador endotelial. Si bien su concentración se incrementa durante el estado activado, tiene una tasa basal de expresión, de manera que cantidades importantes de la molécula se almacenan intracelularmente y son expuestas en la cara apical de la membrana pocos minutos después de la activación endotelial (32).

La transcripción de selectina-E en respuesta al TNF- $\alpha$  es un fenómeno estudiado con interés desde hace tiempo. La aparición del mensajero puede observarse desde los primeros 20 minutos tras la estimulación, y la proteína aparece entre una y dos después en la superficie celular. La expresión máxima ocurre entre las cuatro y las seis h y luego decae rápidamente, llegando a niveles basales tras 24 h del estímulo inicial (33).

La correlación entre la transcripción y la traducción es particularmente buena en este mensajero. La región reguladora ha sido disecada con cuidado utilizando estudios de expresión de genes reporteros, lo que permitió determinar que existe una zona fundamental para la transcripción que abarca aproximadamente 3700 nucleótidos hacia el extremo 5' (34).

Posteriormente, estudios de delección caracterizaron un elemento regulatorio que contiene tres secuencias de unión al factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Es sobre esta región en que recae la inhibición por glucocorticoides de la que este gene es objeto y que ha sido ampliamente estudiada en sistemas inflamatorios (35).

Un segundo elemento en el promotor (NF-ELAM1) corresponde a un sitio CRE/ATF-like en el que ensayos tipo EMSA y *supershift* han identificado la unión de al menos cuatro monómeros de estos factores de transcripción: ATF-a, ATF-1, ATF-3 y c-Jun, sin que quede claro cual es el arreglo particular de homo- o

heterodímeros que se asocian a estos sitios en distintos escenarios fisiológicos (36, 37).

Los tres sitios NF- $\kappa$ B operan de forma cooperativa entre ellos. Los sitios 1 y 2 (entre -125 y -106) están contiguos y parecen ser los primeros en ocuparse (38). El sitio 3 está entre -93 y -84 nucleótidos de distancia, y los tres reconocen las mismas subunidades: el dímero p50/p65. Los sitios 1 y 2 aparecen en los promotores de distintas especies, por lo que parecen estar conservados durante la evolución (39).

Un dato interesante es que el promotor de selectina-E se organiza de manera muy similar al del gene que codifica para IFN- $\gamma$ , no sólo en el sentido de las cajas que contiene sino en la cinética de unión de estos factores y en el arreglo tridimensional que adquiere la cromatina al momento de la transcripción (34)

Se ha estudiado también la regulación negativa de la expresión de selectina-E. Su expresión esta bajo un control temporal que resulta del hecho de que NF- $\kappa$ B esté sujeto a un circuito de autorregulación que asegura su disminución.

En condiciones fisiológicas, la secreción de productos inflamatorios está seguida de la producción de inhibidores (como se discutirá mas tarde). Uno de los productos que los macrófagos producen en las fases tardías a su activación es el TGF- $\beta$  el cual inhibe específicamente la expresión de selectina-E. Esta inhibición ocurre a través de las proteínas *Smad*, que interactúan con NF- $\kappa$ B en los sitios  $\kappa$ B del promotor, previniendo su actividad (40).

## **VCAM-1**

Fue caracterizada inicialmente como molécula de superficie de células endoteliales derivadas de microvasculatura. Ahora se sabe que se presenta también en células dendríticas, macrófagos, mioblastos y miotúbulos (41). Pertenece también a la super-familia de las inmunoglobulinas y su importancia se ha centrado en el reclutamiento de linfocitos durante la inflamación (32). Las moléculas membranales que funcionan como sus ligandos son las integrinas  $\alpha$ 4- $\beta$ 1 (VLA-4) y  $\alpha$ 4- $\beta$ 7 (26). En su organización se encuentran siete dominios C2 de inmunoglobulinas que parecen estructurarse en dos regiones altamente homólogas, lo que sugiere una duplicación intergénica. Purificada a partir de

células HUVECs presenta un peso molecular aparente entre 90 y 110 KDa. VCAM-1 se expresa en células endoteliales como parte también del programa ontogénico (1), durante la proliferación, migración y formación del tubo vascular. En estas condiciones tanto VCAM-1 como ICAM-1 son reguladas a nivel transcripcional por estimulación con el factor de crecimiento vascular (VEGF), un potente inductor angiogénico (42) que se une al receptor celular Flk-1/KDR. En células endoteliales deficientes en este receptor existen serias anomalías en el desarrollo endotelial y desorganización vascular (43).

### **ICAM-1**

Se encuentra como un polipéptido de 55 KDa. Se han identificado también formas solubles en el suero (44) y se le ha involucrado en la metástasis.

También pertenece a la super-familia de las inmunoglobulinas. Se expresa basalmente en proporciones significantes en un reducido grupo de tipos celulares, básicamente monocitos y células endoteliales (26). Es un importante mediador de la respuesta inmune y de la inflamación (45). También media la interacción de las células T con células presentadoras de antígeno y de las interacciones homotípicas y heterotípicas entre células T y B. Su expresión es fuertemente inducida por IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y LPS (46, 47), (48, 49).

Se han caracterizado como sus ligandos específicos a las moléculas LFA-1, MAC-1, CD43, y otras integrinas (26). Como ocurre con otros miembros de la misma familia, la adhesión mediada por ICAM-1 es dependiente de calcio.

### **Selectina-P**

Esta molécula fue caracterizada inicialmente como parte del repertorio de adhesión de células plaquetarias al endotelio vascular y participa en la unión laxa de linfocitos (50).

Se han caracterizado tres sitios NF- $\kappa$ B en *tandem* en el promotor del gen de selectina-P murino (51), mientras que en el gen humano se ha señalado un sitio único capaz de unir al heterodímero p50/p52 que es requerido inequívocamente para la transcripción completa del gene. En condiciones basales éste dímero está



secuestrado en el citoplasma por el inhibidor Bcl-3. En cambio las subunidades que se unen al promotor murino contienen la subunidad p65 (52).

Tanto icosantina como IL-4 inducen la expresión de Selectina-P en células HUVECs, si embargo IL-4 inhibe la expresión dependiente de TNF- $\alpha$  del gene Selectina-E, a cuyo promotor se unen los mismos heterodímeros (53).

La activación endotelial involucra entonces una gran cantidad de cambios que en su mayoría están regulados a nivel transcripcional. Gran parte de la literatura con respecto a esta activación está documentada para células endoteliales estimuladas con citocinas inflamatorias

## **El Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$**

### ***Un factor proteico mediador de necrosis hemorrágica en tumores***

La necrosis hemorrágica de tumores provocada por infecciones de estreptococo, fue observada desde finales del siglo XVIII (54). En 1868, se reportó la regresión espontánea de tumores en pacientes con infecciones bacterianas. Posteriormente, esta observación fue repetida por Coley, administrando preparaciones de cultivos de estreptococos a ratones con tumores inducidos en forma experimental. En este modelo, Coley observó que estas preparaciones de estreptococos en los que se eliminaba la actividad bacteriana por filtración, causan la reducción de las masas tumorales (55),(56). No fue sino hasta 1944 cuando a partir de cultivos de bacterias gram-negativas se purificó el producto bacteriano responsable de la necrosis hemorrágica de tumores, se le llamó **endotoxina** y fue caracterizado como un “lipopolisacárido” bacteriano (57).

Muchos años después se reconoció que no es la endotoxina, sino un producto presente en suero de animales a consecuencia de la inoculación con endotoxina, lo que producía la regresión tumoral. En 1975 Old demostró que el suero derivado de ratones tratados con endotoxina (llamado *suero de necrosis tumoral*) inducía también necrosis hemorrágica en tumores desarrollados en un segundo animal, con efectos menos tóxicos que la administración de endotoxina. La principal aportación de Old fue demostrar que la actividad necrotizante de

tumores era un factor derivado del hospedero y proponer que la fuente principal del factor eran los macrófagos que lo liberaban al suero (58)

Fue entonces que se acuñó el termino “Factor de Necrosis Tumoral”, aunque éste no se purificaría sino hasta una década mas tarde, gracias a su actividad citotóxica sobre tumores murinos. Finalmente Aggarwal en 1985, purificó a partir de medios condicionados de macrófagos, una molecula cuya actividad era responsable de inducir muerte en la línea celular L929 y fue llamada formalmente TNF- $\alpha$  (59).

### ***Un factor protéico inductor de caquexia***

El otro lado de la historia del TNF- $\alpha$  se origina también desde el siglo XIX. Existía la observación del establecimiento de caquexia en algunas enfermedades crónicas. Posteriormente se observó que conejos infectados con *Trypanosoma brucei* pierden mas de la mitad de su masa corporal inicial, a pesar del desarrollo secundario de trigliceridemia ocasionada por la enfermedad (60). Estudios bioquímicos que acompañaban a este análisis revelaron un aumento de casi diez veces de los niveles de VLDL en plasma, aceleración del metabolismo energético, alza en el consumo calórico, lipólisis y recambio de proteínas (61). En otros modelos fue caracterizada la caquexia con mas detalle como una condición que generaba anorexia, pérdida de masa corporal, deshidratación y pérdida de proteínas corporales y de lípidos (56).

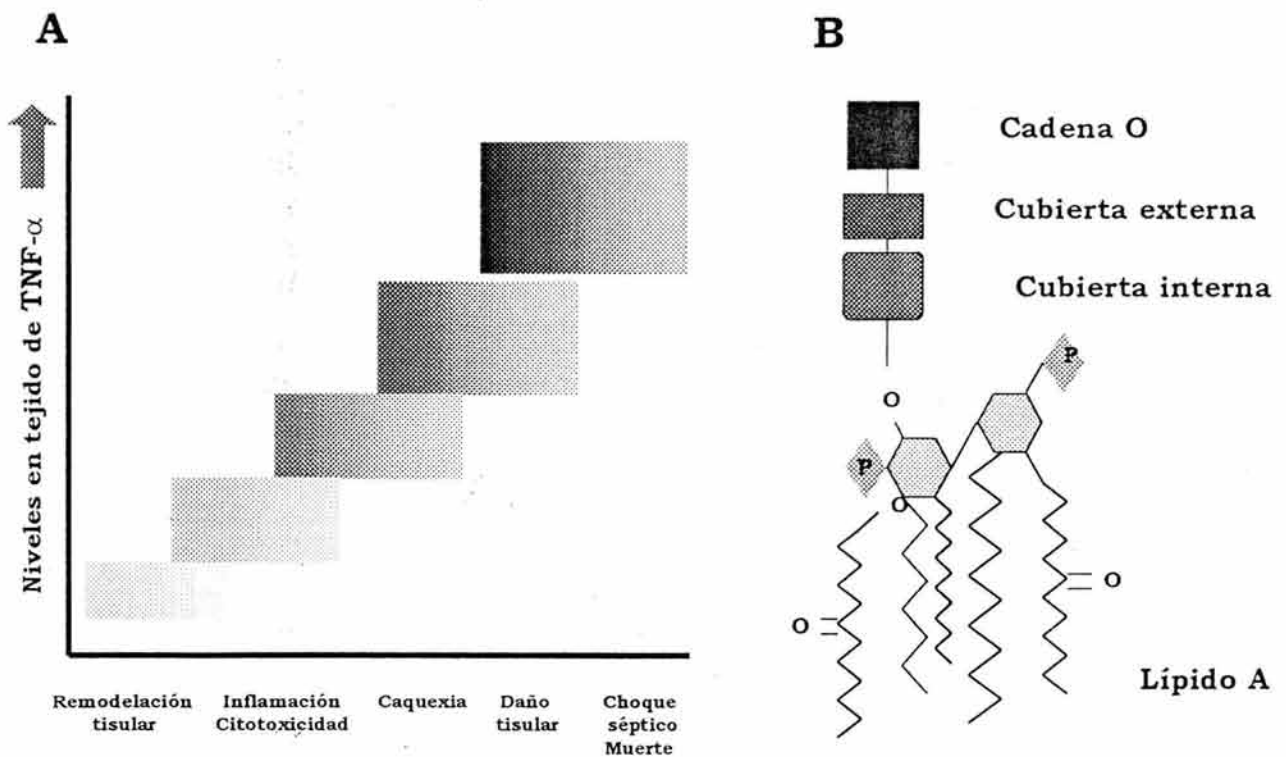
Después se describió un factor proteico presente en el suero responsable de inhibir la actividad de LPL en adipocitos y supresión sistémica de la actividad de lipasa lipoprotéica *in vitro*. Más tarde se descubrió que un estado muy similar a la caquexia podía ser reproducido en ratones tratados con endotoxina bacteriana y que el suero de estos animales podía causar a su vez esta condición si era inoculado a un ratón singénico sano. Como en el caso del TNF- $\alpha$ , esta observación apuntó a que la endotoxina inducía la liberación de factores propios del hospedero que promueven este desbalance fisiológico (62)

En 1985 esta actividad inductora de lipólisis fue purificada a homogeneidad por Beutler como una hormona polipeptídica de alta abundancia en los medios



condicionados de macrófagos murinos, que suprime la actividad de proteína lipasa en células 3T3 a la que denominó **caquectina**: “El 1% de los productos protéicos secretados por células RAW estimuladas con endotoxina, corresponde a la caquectina” (63)

La secuencia de la caquectina fue ingresada a las bases de datos existentes y resultó idéntica a la secuencia reportada para TNF- $\alpha$  unos meses antes. La clonación del gen y la posterior purificación de la proteína ocasionaron un enorme acopio de información alrededor del factor. Fue evidente entonces que el TNF- $\alpha$ , originalmente definido por su actividad antitumoral, desplegaba también distintos efectos sobre células normales y era un potente mediador de inflamación y respuestas inmunes celulares. El estudio del TNF- $\alpha$  se ha vuelto uno de las materias fundamentales en la ciencia biomédica. Su actividad ha resultado ser esencial para entender la respuesta inmune innata.



**Figura 2.- A)** El efecto inducido por el TNF- $\alpha$  depende de las concentraciones extracelulares a las que las células se vean expuestas.

**B)** Estructura del Lipopolisacárido (LPS). El lípido A es la porción mas antigénica de la molécula.

## ***TNF- $\alpha$ : Mediador de patologías diversas***

La variedad de eventos en los que está involucrado el TNF- $\alpha$ , depende a escala sistémica de la ventana espacio-temporal en la que sea producido y, a escala molecular, del balance de las distintas rutas transductoras que pueda desatar en la célula blanco (Figura 2A).

Por ejemplo, una pequeña cantidad de TNF- $\alpha$  recombinante (alrededor de 0.5 mg/Kg de masa corporal) es capaz de provocar hipotensión y aumento de la frecuencia respiratoria, mientras que a dosis más altas (3 mg/Kg de peso corporal) induce taquicardia, acidosis metabólica seguidas de necrosis hemorrágica en pulmón, intestino y distintos órganos (64).

El efecto mejor estudiado del TNF- $\alpha$  a dosis altas y liberado de manera sistémica por macrófagos circulantes es la inducción de choque séptico (65). El choque séptico se origina cuando niveles masivos de TNF- $\alpha$  son liberados a la circulación, provocando activación endotelial masiva a todo lo largo del árbol cardiovascular seguida de muerte celular en corazón, pulmones y otros órganos. Esta patología cobra la vida de aproximadamente el 50 % de los individuos internados en las unidades de terapia intensiva. El choque séptico en la mayoría de los casos comienza como bacteremia episódica (niveles elevados de bacterias en sangre) que a la larga está asociada a cambios sistémicos como leucocitosis, hiperpirexia y taquicardia. Después evoluciona a sepsis, lo cual se refiere a un estado de infección aguda en el que se manifiestan, fiebres intensas, anorexia, letargo y debilidad. El choque séptico ocurre cuando el efecto tóxico de la sepsis lleva al organismo a un estado sistémico de colapso circulatorio (66). Comienza con inestabilidad vascular, que se traduce en vasodilatación, debilidad capilar, coagulopatías y fiebre. La causa última de la muerte durante el choque séptico, es la falla multiorgánica, es decir, una disfunción severa del sistema respiratorio, necrosis cardiaca y hepática, linfocitopenia, hipoxia extendida por todo el organismo, que se refleja incluso en un desacoplamiento masivo de mitocondrias en el músculo esquelético. Prácticamente todo el deterioro está dado por los mecanismos inmunes que se disparan y no por la infección en si (65).

El TNF- $\alpha$  también participa en la remodelación tisular y en la reabsorción de hueso, induciendo importantes cambios en la actividad de metaloproteasas de matriz extracelular y colagenasas.

Farmacológicamente, el efecto que evoca el TNF- $\alpha$  depende no sólo del modelo animal, sino de las dosis e incluso la zona de inoculación. En modelos animales inoculado subcutáneamente causa en pocas horas formación de edema y migración de neutrófilos. La administración local conlleva a hemorragia, necrosis e inflamación localizada. La lista de enfermedades en las que participa es enorme, pero pueden generalizarse en enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas e inflamatorias crónicas (67). Las diferencias entre tan larga lista de efectos puede ser en parte explicado por la concentración extracelular de ligando que sea capaz de acceder a la célula blanco (Figura 2 A).

El TNF- $\alpha$  usualmente se produce en exceso en las enfermedades inflamatorias/autoinmunes crónicas como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. Asimismo, cuando se induce su sobreproducción en modelos animales, se reproducen patologías similares, lo que habla del papel que juega el factor en el desarrollo de estas patologías

(para mas detalles, consultar el apéndice 1: Artículo de Revisión **Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock**, López-Bojórquez, etal).

El gene que codifica para el TNF- $\alpha$  mide 3.6 Kb y está dividido en tres exones. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 en la región de HLA-B muy cerca del gene de TNF- $\beta$ .

Se produce como una proteína transmembranal de 233 residuos de aa. El monómero madura al sufrir un corte proteolítico en el N-terminal. Esta conversión es un proceso altamente regulado que se lleva a cabo por una metaloproteasa unida a la matriz extracelular, llamada enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE). Este corte es uno de los pasos limitantes de la secreción. El TNF- $\alpha$  maduro es una proteína de 157 aa con un puente disulfuro y sin sitios de glicosilación. En soluciones acuosas adquiere estructura de heterotrímero (cada subunidad con 17.3 KDa) con un peso molecular aparente de 63 KDa con un punto isoeléctrico de alrededor de 5.6 (68)

Una vez liberado al espacio extracelular, puede unirse a dos receptores membranales específicos que han sido descritos hasta el momento en todos los tipos celulares. Se ha calculado la existencia de alrededor de 10, 000 sitios de unión por célula. El receptor **p55** tiene un  $K_D$  de  $1 \times 10^{-10}$  M y el receptor **p75**, una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-11}$  M. Estos receptores de alta afinidad inician la transducción de la señal al reclutar distintas proteínas acopladoras y efectoras (ver más adelante) (69).

Aunque es producido por más de un tipo celular (cardiocytes, células endoteliales, linfocitos) sin lugar a duda la principal fuente, no solo de  $TNF-\alpha$  sino del resto de los mediadores inflamatorios lo constituyen las células de linaje mieloide (70).

## **Macrófagos: células versátiles**

Los macrófagos fueron descritos originalmente en 1892 por Mechnikoff, como parte del sistema retículo-endotelial, que agrupaba a una gran variedad de células del sistema inmune. En 1924 fue propuesta por Aschoff la teoría del **sistema de fagocitos mono nucleares** (MPS) que es aceptada casi en su totalidad hasta la fecha. En esta se describe que el MPS está compuesto de los **monocitos** circulantes en sangre, y de la población de **macrófagos** residentes en distintos tejidos del organismo. Aunque los monocitos son los precursores de los macrófagos, el grueso de funciones que pueden llevar a cabo es prácticamente el mismo (71).

Como células circulantes realizan una labor de *patrullaje* y mantenimiento y al madurar a entidades residentes pueden especializarse como células fagocíticas, secretoras, o encargarse del mantenimiento inmune del tejido en el que se alojen. Como macrófagos residentes su vida media varía de 5 a 15 días, presentan una morfología larga y estrellada y durante su maduración pueden crecer de 10 a 15 veces en tamaño con respecto a los monocitos y aumentar en número y/o complejidad de organelos celulares. Son células ubicuas y sus características particulares varían según el tejido en que estén alojadas. Los macrófagos residentes en los tejidos constituyen el principal porcentaje de la población total

del MPS y realizan distintas funciones dependiendo del órgano donde residan (70).

El nombre con el que se denominan histológicamente, refleja su localización particular (macrófagos alveolares en el pulmón, histiocitos en tejido conectivo, células de Kupffer en el hígado, células mesangiales en el riñón, o microglía en el sistema nervioso central). La siguiente lista muestra un promedio del porcentaje de distribución en distintos tejidos del organismo:

Cavidad peritoneal: 10-20%

Cavidad peritoneal durante una reacción inmune: 75-90%

Pulmón: 12-15%

Hígado: 70%

Los macrófagos diferenciados son células irregulares que miden entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Generalmente presentan una alta granulación. Los monocitos en cambio, son células más pequeñas (12-15  $\mu\text{m}$ ). La complejidad estructural varía enormemente según el estado de diferenciación y actividad (72, 73).

### ***Diferenciación mieloide***

Las células precursoras a partir de las cuales se originan los monocitos, son bipotenciales ya que pueden dar origen también a neutrófilos.

Los macrófagos representan el estado terminal de diferenciación de un precursor de todo el linaje mieloide con capacidad pluripotencial y que se encuentra principalmente en la **medula ósea**. Estos precursores mieloides siguen una compleja serie de cambios hasta el estadio final de macrófagos residentes (74). Como células pluripotenciales se dividen hacia monoblastos y, estos a su vez, se diferencian a promonocitos. Las teorías clásicas acerca del linaje mieloide proponen que cada precursor da origen a dos células del siguiente estadio, bajo las condiciones adecuadas de disponibilidad de factores tróficos y de estímulos inmunes. Cada promonocito entonces da lugar a dos monocitos, los monocitos no tienen potencial proliferativo hasta su maduración, pero son capaces de abandonar el sitio de origen, esto es, la médula ósea (70).

Los monocitos tienen actividad endocítica y circulan en el torrente sanguíneo por aproximadamente 8 a 24 h durante las cuales sufren aumento de



tamaño para posteriormente distribuirse en diversos tejidos y completar la ruta de diferenciación, contribuyendo así al continuo recambio de macrófagos

Distintos factores proteicos de crecimiento (o moléculas como prostaglandinas) pueden dirigir el proceso de diferenciación en diferentes direcciones (75). Conforme avanza el proceso de diferenciación, en los macrófagos aumenta el número de receptores para factores de crecimiento presentes en la superficie celular y con ello la sensibilidad a estos, hasta llegar a más de  $1 \times 10^4$  moléculas por célula madura. Este fenómeno se correlaciona con el hecho de que los niveles de ciertos factores de crecimiento son inversamente proporcionales al número de células maduras residentes en los tejidos (76, 77).

El equilibrio entre la sobrevivencia y la muerte, entre la activación y la diferenciación, la presentación de antígenos y la migración, depende de la particular suma de estímulos, que de manera local, recibe cada población celular. En ausencia de factores de supervivencia en los monocitos comprometidos en un estado particular de diferenciación pueden ser activados programas de muerte. Es decir, que no basta con tener el estímulo correcto de diferenciación, es necesario contar con la combinación adecuada que le indica a una célula el camino que debe seguir (78).

Se ha encontrado *in vitro* que las interacciones entre distintas citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y GM-CSF) pueden prevenir la apoptosis espontánea que ocurre normalmente durante la diferenciación (78). La privación de factores tróficos (como CSF-1), también activa programas de muerte celular que están controlados por el equilibrio entre moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. En el caso de las células de linaje monocítico la muerte celular está acompañada de un decremento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL y de factores de transcripción como Ets2 (77). Por otro lado, existe también una correlación entre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, cuyos niveles son elevados en macrófagos maduros, en contraste a lo que ocurre en monocitos en crecimiento. La diferenciación mieloide inducida por ésteres de forbol está directamente relacionada con una activación persistente de NF- $\kappa$ B, un incremento en la actividad de la cinasa IKK y una degradación sostenida del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . Si células U937 son transfectadas con un plásmido que codifica para una dominante negativa de I $\kappa$ B $\alpha$  se previene la diferenciación inducida por PMA (79).

Como parte de los factores de transcripción moduladores de la diferenciación de macrófagos se ha descrito la participación del gen de crecimiento de respuesta temprana (Egr-1). La expresión de este en progenitores hematopoiéticos estimula el desarrollo en dirección a líneas monocíticas a expensas del desarrollo de líneas granulocíticas o eritroides (80).

Por otro lado, la diferenciación de monocitos a macrófagos está regulada por células T y viceversa. Una de las citocinas característica de una respuesta tipo Th2 que es producida por células T, es la IL-10, que bloquea la expresión de moléculas MHCII en poblaciones de macrófagos, pero induce la expresión de FcRs. Es capaz de inducir la apoptosis de estas células, previa a su diferenciación. El efecto negativo que tiene IL-10 en la sobre-expresión del receptor es bloqueado en presencia de IgG, IL-10 suprime entonces la acumulación de macrófagos en tejidos sanos en ausencia del estímulo antigénico y facilita la diferenciación y migración a tejidos en los que hay acumulación de anticuerpos (81).

### ***Activación mieloide***

La activación de macrófagos está definida como la adquisición de la capacidad de realizar una respuesta compleja, misma que se encuentra en el centro de la respuesta inmune innata.

A pesar de que los macrófagos han sido estudiados por más de un siglo, la era actual de la activación mieloide comienza en los años sesentas con la disección del paso de resistencia adquirida a resistencia facultativa en infecciones de parásitos intracelulares. Esta resistencia es mediada por lo que entonces se llamó, un grupo de macrófagos “enojados”, el término acuñado se utilizó para referirse a la adquisición de la capacidad de amplificar la función *macrobicida* o *tumorocida*. (72). Ahora la activación de macrófagos en realidad se reconoce como dos procesos independientes: uno que capacita a la célula haciéndola responsiva a endotoxina, y otra en la que la activación está medida directamente por un antígeno específico. El modelo clásico se describió con dos señales primordiales,

IFN- $\gamma$  y LPS, las cuales respectivamente preparan y disparan el fenómeno de activación (82).

Sin embargo, *in vivo*, la activación es mucho más compleja y ocurre como secuela de la integración de distintas señales. Es de hecho un programa que puede ser llevado a cabo de más de una manera. Depende del respectivo contexto de cada célula, de los factores a los que se vea expuesta y del particular camino por el que las células hayan madurado.

Los macrófagos son células especializadas en reconocer estímulos antigénicos. Los receptores a moléculas como endotoxina, ácido lipoteitóico, lipofosfoglicanos y otras moléculas localizadas en la superficie de organismos patógenos, han sido caracterizados principalmente en células mieloides (83).

La endotoxina bacteriana es reconocida como la señal prototípica activadora de macrófagos, y como tal ha sido sometida a un análisis cuidadoso. Es el componente mayoritario de la superficie de bacterias gram-negativas. A través de la circulación se mueve unido a la proteína acarreadora de LPS (LBP) (57). La porción con mayor capacidad activadora del LPS es el lípido A (Figura 2 B), aunque en menor medida el resto de su estructura puede ser reconocida también por moléculas membranales (84).

En los últimos años se ha acumulado bastante información acerca del mecanismo exacto por el que esta molécula desempeña su pleiotrópica actividad. La estructura del lípido A fue dilucidada la década pasada y su interacción con las células comenzó a estudiarse a escala molecular al encontrar el receptor específico responsable de su transducción.

### ***Los receptores Toll***

Las mutaciones que confieren resistencia a enfermedades infecciosas han sido utilizadas durante años como herramienta para buscar los intermediarios moleculares que acoplan la cascada inflamatoria. Durante muchos años se caracterizaron genéticamente estas mutantes y se aislaron una gran cantidad de genes y de proteínas involucrados en estos procesos (85, 86). Una de estas mutaciones resultaba en un fenotipo resistente a infecciones por bacterias gram-negativas. Los estudios genéticos determinaron que la deficiencia se



encontraba directamente en la molécula que funciona como receptor de la endotoxina, por lo que al locus se le llamó *Lps* (57). Casi 50 años después de que se aisló la población de ratones *Lps* <sup>-/-</sup>, se clonó el receptor membranal responsable de la unión directa al lipopolisacárido. Se llamó **Toll like receptor (TLR)** por su homología con el receptor Toll, clonado en *Drosophila* y acoplado a una vía de señalización activable durante la defensa del insecto a patógenos (87). A partir de este momento comenzaron a caracterizarse en mamíferos una gran cantidad de proteínas relacionadas con Toll. Los TRL son una familia de proteínas, todas ellas alineadas a partir del dominio Toll y casi todas ellas son receptoras trans-membranales que reconocen específicamente uno o más antígenos relacionados con patogenicias infecciosas (88-90).

La molécula de LPS viaja en circulación con su región mas hidrofóbica inmersa en la proteína LBP y es reconocida por el complejo membranal que forman el receptor TLR4, el adaptador MD-2 y el co-receptor CD14.

A través del dominio Toll se unen al receptor TLR4 distintas proteínas acopladoras (91). La proteína MyD88, forma el puente entre el receptor y la cinasa TRAF6, quien a su vez es la encargada de reclutar al complejo IKK (y consecuentemente a NF-κB) y a otras vías de transducción (92).

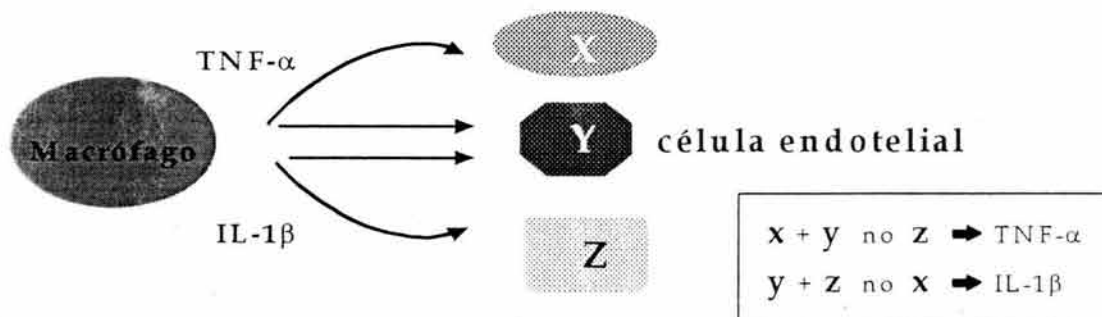
La proteína MyD88 fue caracterizada originalmente como un gene de diferenciación mieloide. Ahora se sabe que durante la maduración de los promonocitos, se expresan y ensamblan secuencialmente todos los miembros de la cascada de transducción de LPS y el receptor TLR4 antes mencionados (93). La última proteína en ser expresada es precisamente MyD88 y es hasta que esto ocurre que la célula se vuelve receptiva a la activación por LPS (94).

## **Productos de secreción de macrófagos activados**

A pesar de que históricamente, los macrófagos han sido descritos como células fagocíticas (95), su capacidad secretora fue extensamente estudiada apenas hasta la década de los setentas (96), y hoy son reconocidos como las células secretoras por excelencia dentro del sistema inmune (97).

Se han caracterizado cerca de 300 productos distintos que estas células producen y secretan al espacio extracelular durante el proceso inflamatorio completo. En las primeras horas, los productos tienen naturaleza activadora, es decir, son estímulos pro-inflamatorios que se asocian a una respuesta Th1 (T helper type 1). Sin embargo, la activación conlleva a un proceso de muerte celular que depende de una cascada apoptótica que provoca la muerte en el transcurso de las siguientes 24 a 48 h que siguen a la activación. La gran capacidad secretora de los macrófagos activados se refleja en el hecho de que durante su vida estas células son capaces de secretar varias veces su masa.

Los macrófagos son capaces de producir todas las citocinas inflamatorias descritas, además de enzimas, inhibidores enzimáticos, componentes del complemento, intermediarios del ácido araquidónico, intermediarios reactivos de oxígeno y factores de coagulación (Ver tabla 1). No es entonces de extrañar que los pesos moleculares de estos productos abarquen desde 32 Da (anión súper-oxido) hasta 440,000 Da (fibronectina) con efectos celulares tan diversos, como la proliferación celular ó la inducción de apoptosis (71, 98). Acerca de la diversidad de los productos que un macrófago puede secretar en condiciones de activación, cabe señalar que:



**Figura 3.-** El hecho de que las actividades de algunas citocinas sea aparentemente redundante, puede explicarse en términos de las distintas poblaciones celulares que son blanco de ellas. La célula endotelial (y) puede activarse de manera prácticamente equivalente, por efecto de TNF-α e IL-1β, sin embargo, en ciertos momentos puede requerirse el reclutamiento de otros tipos celulares (x, z) de manera independiente. Para este caso, la secreción de una citocina y no la otra puede, diferenciar la activación de x ó z y al mismo tiempo, actuar sobre la célula endotelial (y)

- Un sólo producto puede tener distintas actividades
- Una sola actividad puede ser el reflejo de varios productos
- Prácticamente nunca un producto se secreta aisladamente.

Es fácil imaginar entonces la gran complejidad de interacciones que pueden establecerse entre los distintos productos que forman parte del contexto inflamatorio.

### ***¿La actividad de TNF- $\alpha$ y de IL-1 se traslapan?***

Un caso interesante de estas tres generalidades y que merece ser discutido aquí, es la multiplicidad de actividades que presentan el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . A pesar de que sus actividades y efectos biológicos se traslapan, es importante hacer notar que cada una fue purificada a partir de bioensayos basados en distintas actividades biológicas (99). Después, con la clonación y producción recombinante de estas moléculas, se caracterizaron una gran variedad de eventos en los que ambas están involucradas: niveles hormonales alterados, choque, coagulopatías, adherencia de leucocitos al endotelio, catabolismo muscular, fibrosis, remodelación de hueso, etc. (100).

¿Por qué un macrófago transcribe al menos dos diferentes genes que codifican para actividades pleiotrópicas tan potentes? La respuesta a ésta pregunta puede estar en las actividades biológicas de citocinas que no sobrelapan. Esto puede entenderse en términos de la respuesta de otros tipos celulares involucrados (70). Es decir que la gran variedad de productos secretados tiene como blanco **distintas poblaciones celulares**, y regula a distintos niveles los eventos de la cascada de la sepsis (Figura 3).

Por ejemplo, se ven afectados hepatocitos en los que se encienden procesos de transcripción de proteínas de fase aguda, se activan linfocitos y polimorfos nucleares que migran y se adhieren a la pared vascular, se presentan alteraciones energéticas y metabólicas en células musculares y adipocitos (101, 102). Estos distintos efectos pueden ser encendidos por señales que parecerían redundantes pero que tienen sentido como parte de la red de regulación que ocurre en todo el organismo a consecuencia de las señales que secretan los macrófagos

## ***Interleucina 1-beta***

El descubrimiento de la actividad de la IL-1 $\beta$  sobrevino como consecuencia de sus propiedades pirógenas (103). Fue inicialmente purificada por su habilidad de actuar como co-activador de linfocitos, aunque su participación como mediador inflamatorio es en realidad su efecto más duradero y agresivo (99). Hasta la fecha se le reconoce como el pirógeno endógeno más eficaz (104).

Las principales fuentes de IL-1 son macrófagos, keratinocitos, timocitos, células T, y células endoteliales (48, 105).

Esta citocina es traducida como un precursor de membrana de 31 KDa sin péptido señal y la citocina madura es una molécula de 17.5 KDa; su conversión a proteína soluble esta mediada por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE) una proteasa de la familia de las caspasas. Es cortada entonces en el extremo C-terminal a un péptido de 160 aa. La secreción es atípica en el sentido de que no hay péptido señal, y la maduración termina en el exterior de la célula por acción de una proteasa que simultáneamente secretan los macrófagos (106) (56).

La forma madura es liberada al torrente sanguíneo como un péptido de 17.5 KDa. Se une al receptor tipo I (**IL-1 $\beta$ R**) que forma un heterodímero con el correceptor IL-1 $\beta$ /AcP, que a su vez recluta la proteína acopladora IRAK y la cinasa TRAF6 (107). De ahí se induce una cascada de señales que termina movilizando factores de transcripción como NF- $\kappa$ B ó NF-IL6 (108). Por mucho tiempo se pensó que la transducción de la IL-1 $\beta$  estaba asociada a la activación de la cinasa NIK, sin embargo, ahora parece que las interacciones de NIK no son reproducibles *in vivo*. Los modelos actuales plantean la incorporación del complejo de cinasas TAK1/TAB1(109) (de la familia MAPK) que a su vez que reclutan IKK $\beta$  y que es directamente responsable de la activación de NF- $\kappa$ B. Una vez que la señal es dirigida al núcleo se induce la expresión de una enorme cantidad de genes: citocinas, receptores de citocinas, mediadores pro-inflamatorios, factores de coagulación, etc.

Como la mayoría de las citocinas, la IL-1 $\beta$  tiene variedad de efectos dependiendo del tipo celular blanco: induce proliferación celular en linfocitos, y

fibroblastos, participa en el choque séptico, la inducción de fiebre la reabsorción de hueso, etc.

### ***Interleucina-6***

Fue purificada a partir de medios condicionados de células T transformadas con HTVL-1 por su efecto hematopoiético, es decir, la capacidad de inducción de colonias de células de bazo o medula ósea. El efecto clínico mejor caracterizado es la inducción de proteínas de fase aguda (110) (111). Aunque también se secreta como inductora de inflamación y hematopoyesis (106).

La IL-6 humana es una proteína de 186 aa glicosilada en las posiciones 73 y 172. Es sintetizada como un precursor de 212 aa. En monocitos se producen al menos seis isoformas con distintos pesos moleculares, desde 21 hasta 28 KDa, que son diferencias producidas por distintas modificaciones postraduccionales (fosforilaciones y glicosilaciones). La principal fuente de IL-6 son los monocitos-macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales. Su producción está también regulada por endotoxina y es inhibida por glucocorticoides. Distintos factores que incrementan los niveles intracelulares de cAMP y ionoforos de calcio, promueven su transcripción (112-114). Hay en su promotor un sitio NF- $\kappa$ B y un sitio AP-1, así como el elemento NF-IL6 (46) (115).

El receptor de IL-6 consta de tres subunidades: la cadena  $\alpha$ , una glicoproteína transmembranal de 80 KDa que une IL-6 con baja afinidad, la cadena  $\beta$ ; y una cadena con región citoplásmica de unión al resto del complejo de activación que se forma al unirse el receptor a IL-6 (116, 117).

Distintos tipos celulares reaccionan a esta citocina de diferentes maneras: induce producción de proteínas de fase aguda en hepatocitos, fenotipo activado en células endoteliales, secreción de Ig en linfocitos B, etc. Además, inoculada en modelos animales, puede ocasionar fiebre, caquexia, inflamación, etc. (117) Ha sido caracterizada en particular como la citocina involucrada en síntesis de proteínas de fase aguda (118) (119)

### **El factor de transcripción NF- $\kappa$ B**

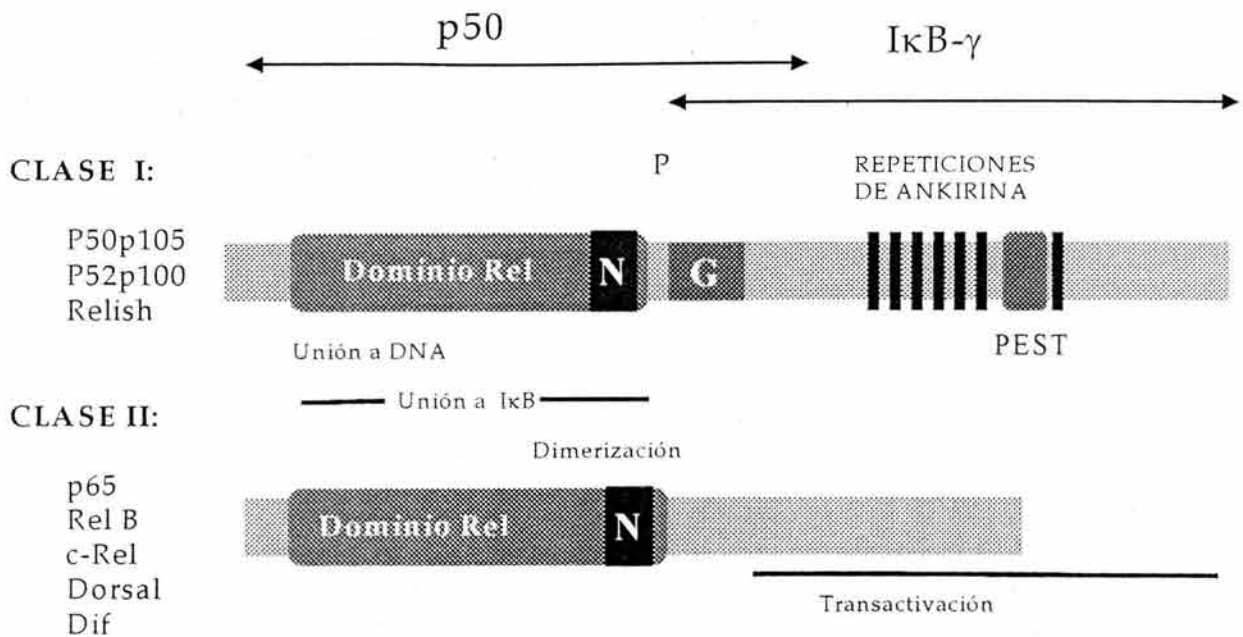


Como parte de la caracterización de la región promotora de los genes que codifican para la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulinas, fueron aislados diversas proteínas reguladoras de la transcripción. Una de ellas fue llamada **factor nuclear de la cadena  $\kappa$  de linfocitos B** o NF- $\kappa$ B (120). A lo largo del tiempo, esta entidad fue relacionada con un gran conjunto de manifestaciones biológicas del sistema inmune. Se ha establecido su participación en la transcripción de numerosos genes que son regulados de manera aguda durante la respuesta inmune innata y durante la diferenciación linfoide (121) (122).

Existen cinco miembros de la **familia NF- $\kappa$ B**: c-Rel (Rel), p65 (RelA), RelB, p50/p105 (NF $\kappa$ B1) y p100/p52 (NF $\kappa$ B2). En conjunto, estas proteínas regulan la expresión de genes que codifican citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, péptidos antimicrobianos, y muchos otros (123). El factor como tal posee un N-terminal altamente conservado llamado **Dominio Rel** (124). Esta secuencia media la interacción con el DNA y la dimerización de la molécula. Todas las proteínas NF- $\kappa$ B interactúan con un grupo de proteínas inhibidoras llamadas **I $\kappa$ Bs** (125). I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$  se consideran los prototipos de esta familia que esta compuesta por siete miembros. Hay que resaltar que las formas precursoras p100 y p105 de los genes NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2 tiene también dominio Rel (126). Las proteínas I $\kappa$ B presentan dominios de ankirina repetidos que interactúan con el dominio Rel presente en las moléculas de NF- $\kappa$ B (127). Estas repeticiones de anquirina son removidas de p100 y p105 por el proteasoma celular para generar las isoformas de NF- $\kappa$ B p50 y p52 que son transcripcionalmente competentes (128) (Figura 4).

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que opera como homo o heterodímero de distintos miembros de la familia Rel o NF- $\kappa$ B. Cada una de las distintas configuraciones en las que puede arreglarse tienen diferente actividad transcripcional y algunas de las isoformas de NF- $\kappa$ B que constituyen al dímero activo son específicas de ciertos linajes celulares. Del mismo modo cada dímero tiene distinta capacidad de unirse a una isoforma de la familia de proteínas

inhibidoras IκB (129). Así que el número de combinaciones de arreglos de NF-



**Figura 4.- Familia Rel.** Las proteínas que pertenecen a la familia NF-κB. Las Clase I son aquellas que además del dominio Rel (de unión a DNA) tiene dominios de ankirina, que son removidos después por proteólisis para activar al factor de transcripción. Las Clase II se sintetizan como monómeros, que no necesitan modificación protraducciona para actuar como factores de transcripción activos.

κB/IκB puede explicar en parte la gran variedad de fenómenos en los que participa.

Cabe mencionar que uno de los genes de respuesta rápida activados por NF-κB es el que codifica para la proteína inhibidora IκB-α. Así, esta se expresa y recaptura en el citoplasma a NF-κB de manera que se cierra un circuito regulatorio que permite una ventana temporal discreta en la actividad del factor (130).

La degradación de las proteínas IκB que permite a las moléculas de NF-κB moverse hacia el núcleo se lleva a cabo por el proteasoma pero ocurre solamente después de haber sido fosforiladas por IKK (131). El **complejo IKK** está formado por tres subunidades: IKKβ, IKKα y NEMO ó IKKγ (132) este último sin actividad catalítica pero de carácter regulatorio. In vitro, tanto IKKβ como IKKα tienen actividad de cinasa sobre dos residuos de serina: ser 32 y 36 (para IκB-α) en el N-terminal de IκB (133). In vivo sin embargo, la actividad predominante de recae sobre IKKβ.

Una vez fosforilada, I $\kappa$ B es reconocida por b-TrCP, un componente del **complejo de ubiquitinación SCF** (skp-1/C1/Fbox) que se encarga de poli-ubiquitinar I $\kappa$ B y de su subsecuente degradación en el proteosoma (134) (135). Aparentemente IKK $\alpha$  media la fosforilación de p100 resultando en la generación de p52. Por el momento no es claro cual es la vía responsable de activar IKK $\beta$ , aún cuando resulta claro que NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) al menos *in vitro*, es la responsable de la activación de IKK $\alpha$  fosforilandola a través de un circuito autorregulado (136).

(para más detalles, consultar el apéndice 2: Artículo de Revisión **La regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B: un mediador en el proceso inflamatorio** López-Bojórquez )

### **La activación de NF- $\kappa$ B mediada por citocinas inflamatorias**

La ruta clásica de activación de NF- $\kappa$ B es mediada por IKK $\beta$  y la fosforilación de I $\kappa$ B. Esta vía “canónica” está acoplada a todos los estímulos inflamatorios conocidos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS). En contraste, la vía que se considera no clásica involucra la actividad de IKK $\alpha$ , la fosforilación de p100 y su subsecuente procesamiento a p52.

El receptor de TNF- $\alpha$  forma en presencia del ligando un complejo llamado disco de activación (137, 138). Se han identificado una gran variedad de proteínas capaces de establecer interacción con el dominio intracelular del receptor tipo I (**TNFR1**) (139). Una de ellas, TRAF2, se une *in vitro* a la cinasa NIK. Además, se acoplan al receptor a través del dominio de muerte (DD), los adaptadores TRADD y FADD (140), ambos sin actividad de cinasa pero que pueden articularse con otras proteínas conectadas a distintas vías (141). Este complejo promueve la activación de proteasas de la familia de las caspasas, efectoras de muerte apoptótica (142).

El receptor de IL-1 $\beta$  forma también un disco de activación, cuya conformación está mediada por la unión del ligando. A través de un dominio TIRL, se reclutan distintas proteínas acopladoras (TRAF6, IRAK) que transducen posteriormente la señal hacia la vía de NF- $\kappa$ B (106).

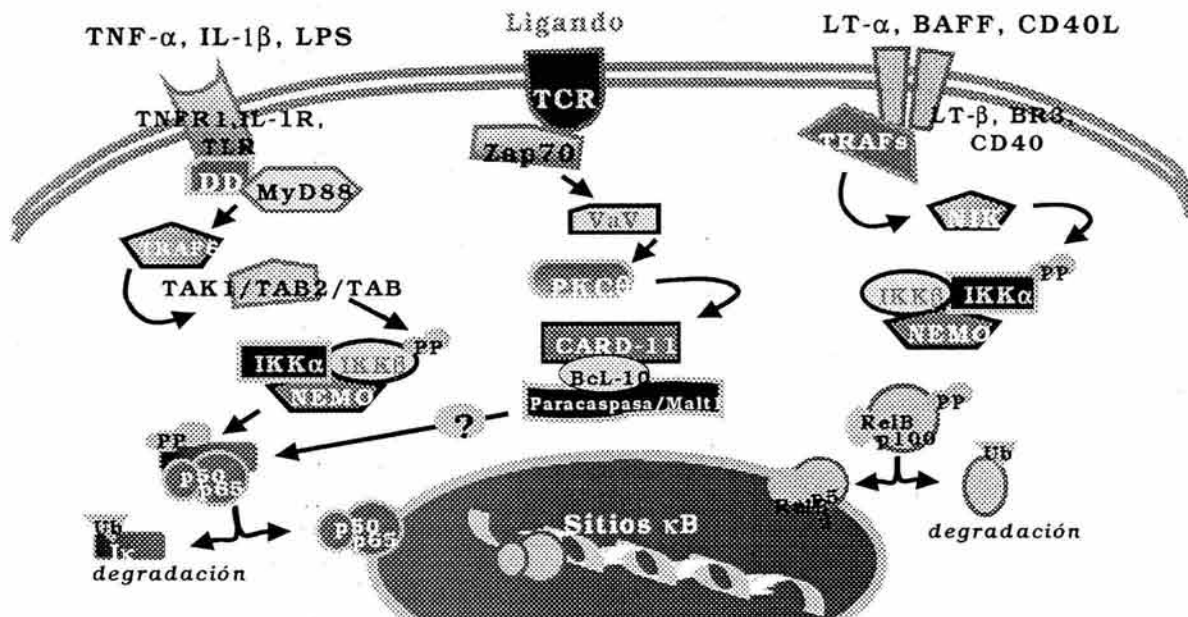


Aunque durante mucho tiempo se consideró que la cinasa NIK era la responsable de transducir la señal del receptor de TNF- $\alpha$  hacia NF- $\kappa$ B, los modelos más recientes plantean que *in vivo*, tanto TNF- $\alpha$ , como IL-1 $\beta$  y LPS están vinculados con el adaptador MyD88 y las cinasa TRAF6 (143, 144). Recientemente, se incorporó a la cinasa TAK1 (una MAP3K) como parte cardinal de la vía iniciada por los receptores de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Posteriormente la fosforilación de I $\kappa$ B está mediada por las subunidad IKK $\beta$  del complejo IKK (145) (Figura 5).

### Muchas vías llevan a NF- $\kappa$ B

A pesar de que la vía clásica de NF- $\kappa$ B fue descrita hace casi quince años, se han descubierto hasta este momento muchas condiciones alternativas que activan este factor (Figura 5).

El complejo I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B puede ser traslocado al núcleo al revelarse parcialmente la secuencia de localización nuclear de uno de los homodimeros



**Figura 5.- Distintas vías de transducción pueden activar a NF- $\kappa$ B.** Esquema de los distintos caminos que pueden partir de los receptores membranales. Red elemental de interacciones entre distintos componentes de las vías.

(146). Otros trabajos señalan que el complejo I $\kappa$ B $\beta$ /p65 se encuentra primariamente en el citoplasma ya que I $\kappa$ B $\beta$  se articula a la proteína accesoria  $\kappa$ B-Ras que impide su fosforilación por parte de IKK (147, 148).

La literatura propone que el nodo central de la activación de NF- $\kappa$ B, lo constituye la traslocación del factor activado hacia el núcleo, sin embargo, la estructura cristalina del complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B recientemente reveló que solamente se encuentra oculta una de las señales de localización nuclear, lo que puede permitir en algunas condiciones la entrada de todo el complejo hacia el compartimiento nuclear (149).

El otro camino que involucra a NF- $\kappa$ B es el relacionado con los procesos de diferenciación celular del sistema inmune. El receptor de linfotoxina- $\beta$  y el receptor BAFF (150), involucrado en la diferenciación y sobrevivencia linfoide también inducen señales que culminan en la activación de este factor de transcripción. Ratones *knockout* en los genes NFKB1 y NFKB2 son deficientes en la maduración y migración de linfocitos B, fenotipo similar al que presentan los animales *null* en BAFF (102, 151). Estos hallazgos confieren un papel fundamental al gene NFKB2 en la maduración de células B. Curiosamente, la falta de NIK también produce un fenotipo parecido. Como ya se ha mencionado se ha desligado a NIK de la vía inducida por citocinas inflamatorias, en contraste, su papel en la maduración de p100 a p52, parece ser vital (152).

La ubiquitinación y procesamiento de p100 accionado por LPS requiere que ocurra simultáneamente a la traducción lo cual sugiere un proceso dependiente del ribosoma. De hecho experimentos con el sistema de *doble híbrido* apuntan hacia la proteína de ribosoma S9 como parte del mecanismo de proteólisis de p100 (153).

Independientemente del proteasoma, existen mecanismos alternativos que degradan I $\kappa$ B- $\alpha$ . Por ejemplo, proteasas tipo calpaina son capaces de realizar esta actividad (154). Estas enzimas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, en particular  $\mu$ -calpaina, puede degradar I $\kappa$ B a través del dominio PEST de I $\kappa$ B en un proceso sensible a inhibidores endógenos como calpstatina (155).

Una vez en el núcleo, NF- $\kappa$ B puede establecer relación con proteínas asociadas a la cromatina. Por ejemplo, la activación dependiente de LPS aumenta la unión secundaria de AP-1 a su secuencia canónica de unión en el DNA (156).

Otras cinasas también han sido involucradas con la fosforilación directa del factor como la proteína MAPK38 quien tiene actividad sobre la estructura de la cromatina y regula el reclutamiento de NF- $\kappa$ B a promotores específicos (157).

Aunque casi todas las familia PKC pueden activar NF- $\kappa$ B, esta particularmente bien documentado el caso de las PKCs atípicas  $\lambda$  y  $\zeta$  (158). Dominantes negativas de estas cinasas inhiben la activación del factor. Por otro lado animales *knockout* en PKC- $\zeta$ , exhiben deficiencias en el desarrollo de órganos linfoides secundarios (159) (160).

A pesar de todas estas aportaciones recientes, que sugieren variantes en el mecanismo de activación, la vía canónica todavía se refiere a la fosforilación de I $\kappa$ B por IKK y a la traslocación del NF- $\kappa$ B al núcleo.

## **La familia de proteínas I $\kappa$ B**

Todas las proteínas que pertenecen a la familia de inhibidores I $\kappa$ B pueden alinearse a partir de los dominios repetidos de anquirina, de las que presentan entre 5 y 9 repeticiones (Figura 6). Estos dominios permiten uniones específicas proteína-proteína y acoplan a la molécula en forma “cilíndrica” y en uno de sus extremos se asocia el dímero NF- $\kappa$ B (161, 162).

Están caracterizadas en mamíferos 5 isoformas de esta familia, cada una con distinta función celular: I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , Bcl-3 (Figura 6).

Las proteínas p100 y p105 que son sintetizadas como precursores de los homodímeros p52 y p50 respectivamente, contienen también estas repeticiones de anquirina que les permiten plegarse sobre sí mismas para ocultar las secuencias de localización nuclear correspondientes al dominio de factor de transcripción (163).

Las llamadas I $\kappa$ B's pequeñas son I $\kappa$ B- $\alpha$  I $\kappa$ B- $\beta$  y I $\kappa$ B- $\epsilon$ . Estas son degradadas en respuesta a los estímulos clásicos responsables de la activación de NF- $\kappa$ B, es decir, citocinas inflamatorias o endotoxina. Funcionan en prácticamente todos los

tipos celulares y se comportan de manera cooperativa. Esto es, presentan una degradación secuencial que permite sostener la activación de NF- $\kappa$ B por encima del circuito regulatorio que actúa a través de la inducción del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Está bien documentado que en respuesta a TNF- $\alpha$  se degrada primero la isoforma I $\kappa$ B- $\alpha$  y es posible visualizar su desaparición en ensayos de *western blot* a partir de extractos citoplásmicos, desde los primeros 5 min tras la estimulación con TNF- $\alpha$  (164). Posteriormente, la degradación secuencial de I $\kappa$ B- $\beta$  y de I $\kappa$ B- $\epsilon$  permite sostener la respuesta dependiente de NF- $\kappa$ B (165). Uno de los promotores que responden de manera inmediata a NF- $\kappa$ B es el del gen del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ . En aquellas condiciones en las que la activación debe ser atenuada lo antes posible, la síntesis inmediata de I $\kappa$ B- $\alpha$  juega un papel muy importante. Además de su función citoplásmica, I $\kappa$ B- $\alpha$  puede también viajar al compartimiento nuclear para unirse al factor una vez que este se encuentra asociado a la cromatina. Con ello puede reprimir su actividad aún después de que NF- $\kappa$ B ha sido liberado de la isoforma I $\kappa$ B- $\alpha$  que lo retenía en el citoplasma (166).

### **I $\kappa$ B- $\alpha$**

Esta isoforma fue la primera en ser descrita y es también la mejor estudiada. Tiene un peso molecular de 35 kDa y su estructura cristalina ha sido descrita unida al dímero p50/p65 (167). Es la más abundante de todas y se degrada de manera rápida en respuesta a estímulos activadores (134).

Como se ha mencionado, esta isoforma puede entrar al núcleo y desplazar a NF- $\kappa$ B de su sitio de unión en el DNA(149). Es el inhibidor endógeno más potente de la actividad de NF- $\kappa$ B, capaz de inhibir la actividad transcripcional de un gene reportero cinco veces más que lo que se logra con I $\kappa$ B- $\beta$ , aunque endógenamente ambos se acumulan y expresan al mismo nivel (168).

## I $\kappa$ B- $\beta$

Fue purificada originalmente de extractos citoplásmicos de células de pulmón de conejo. Es un polipéptido de 359 aa con un peso molecular entre 41 y 45 KDa y con seis repeticiones de anquirina, notablemente espaciadas entre sí (169).

Su cinética de activación es algo más lenta que la de I $\kappa$ B- $\alpha$ , y responde a prácticamente todos los estímulos que degradan a esta última; lo contrario, sin embargo, no necesariamente ocurre. Su promotor también responde a NF- $\kappa$ B de manera que igualmente forma parte del circuito auto-inhibitorio del factor (170).

*In vitro* ambas proteínas tienen distinta capacidad de unión a NF- $\kappa$ B. Se ha descrito que esta isoforma une los mismos dímeros que I $\kappa$ B- $\alpha$  pero con menor afinidad. Por otro lado, I $\kappa$ B- $\beta$  fosforilada (165) puede disociar la unión cooperativa de NF- $\kappa$ B con la proteína nuclear HMG-1 (38). La forma no fosforilada se ha visto asociada al complejo NF- $\kappa$ B cromatina, posiblemente como parte de un mecanismo de terminación de la transcripción (171).

## I $\kappa$ B- $\epsilon$

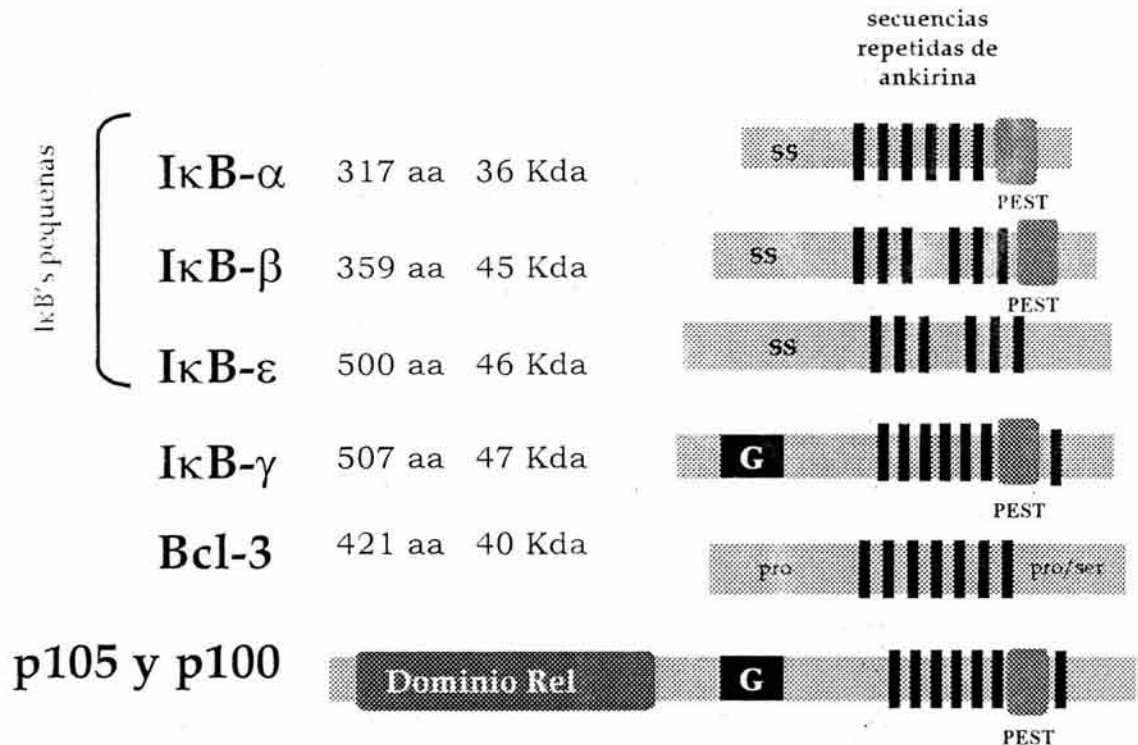
Esta isoforma también es fosforilada por muchos de los estímulos conocidos que activan NF- $\kappa$ B, sin embargo, resulta notable que la cinética de degradación que presenta es más lenta y sostenida que I $\kappa$ B- $\alpha$  (172). I $\kappa$ B- $\epsilon$  también puede desplazarse al núcleo aunque de manera menos eficiente que I $\kappa$ B- $\alpha$ . Otra diferencia importante es que esta isoforma tiene predilección por el dímero c-Rel/p65 (173). Se ha estudiado la participación de I $\kappa$ B- $\epsilon$  en la transcripción de genes activados específicamente por c-Rel/p65, como el caso de la molécula de adhesión V-CAM que se expresa durante la activación endotelial (174).

En general, las distintas isoformas de I $\kappa$ B tienen funciones reguladoras más finas que el simple ocultamiento de las secuencias de localización nuclear de NF- $\kappa$ B. Pueden modular la actividad del factor a distintos niveles. La fosforilación

y la degradación de IκB son entonces pasos limitantes de la vía de transducción de NF-κB y pueden ser catalizados por muchos mecanismos alternativos. Como se ha mencionado, IκB compite por NF-κB con el aparato de transcripción basal (175). De hecho existe una correlación entre la capacidad de inhibir la unión al DNA y la eficiencia para terminar la transcripción dependiente de NF-κB *in vivo*.

(para más detalles, consultar el apéndice 3: Artículo de Revisión **Papel de las proteínas inhibidoras IκB en la regulación del factor de transcripción NF-κB** López-Bojorquez )

Muchas de las aproximaciones terapéuticas en las que la actividad de NF-κB es el blanco principal, están asociadas en realidad a la degradación de IκB. Salicilatos y sulfazalacina inhiben la fosforilación (176) mientras que ciclosporina A y lactacistina, interfieren con la degradación de esta proteína (177-179).



**Figura 6.- Estructura de las proteínas IκB.** Alineación a partir de los dominios de anquirina, con los que interactúan con el dominio Rel de las proteínas NF-κB impidiéndoles su entrada al núcleo

La inhibición *in vivo* de la respuesta inflamatoria mediada por NF-κB ha sido una meta clínica difícil de alcanzar, por un lado por la enorme variedad de vías y de efectos en los que este factor participa, y por otro, porque en muchas



patologías NF- $\kappa$ B no resulta ser el nodo de regulación, sino solo parte importante de una compleja red de señales (180).

El choque séptico y las enfermedades autoinmunes no son fáciles de estudiar por la imposibilidad de establecer modelos animales adecuados en los que las variables experimentales puedan ser vigiladas de manera aceptable. La inyección de endotoxina o de TNF- $\alpha$  en modelos animales permitió mucho del conocimiento fisiológico de estas enfermedades. Los modelos *in vitro*, por otro lado, aunque responden preguntas bioquímicas y moleculares y establecen caminos de búsqueda clínica, no son extrapolables a las condiciones reales de las patologías que se presentan (181).

No sólo por las implicaciones farmacológicas, sino por las diferencias fisiológicas entre distintos organismos, resulta difícil establecer adecuados modelos de estudio. Los fenómenos bioquímicos y moleculares por ejemplo han sido extensamente estudiados utilizando líneas de cultivos celulares y citocinas recombinantes, sin embargo no son estas las condiciones fisiológicas en las que se da el reconocimiento entre los mediadores solubles del sistema inmune y las células que participan en la respuesta inflamatoria.

## JUSTIFICACIÓN

La activación endotelial *in vitro* mediada por citocinas recombinantes (particularmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) ha sido caracterizada *in extenso*. Sin embargo *in vivo*, la célula endotelial no está expuesta sólo a estas dos citocinas, sino a una compleja red de factores secretados por macrófagos activados junto con el TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

A la fecha resulta imposible analizar estas interacciones *in vivo*, lo que ha llevado al desarrollo de una variedad de modelos *in vitro* donde es posible evaluar la activación endotelial mediada por el contexto de factores que son co-secretados junto con TNF- $\alpha$ . A pesar de la amplia aplicación de este tipo de modelos, siempre resulta difícil extrapolar los hallazgos *in vitro* con lo que ocurre *in vivo* durante la reacción inflamatoria.

### Validación del modelo experimental

Por todo lo anterior, decidimos utilizar medios condicionados de macrófagos activados *in vitro* con endotoxina (LPS) para activar cultivos de células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana, en el supuesto de que estos medios condicionados *in vitro* son un reflejo del contexto de factores que la célula endotelial ve, acompañando a TNF- $\alpha$  *in vivo*. Para medir la activación endotelial utilizamos como marcador molecular la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La comparación de la activación endotelial mediada por estos medios condicionados, fue hecha en todo momento contrastando con la activación mediada por TNF- $\alpha$  recombinante, un perfil que ha sido extensamente caracterizado *in vitro*.

## HIPÓTESIS

El contexto de factores co-secretado con TNF- $\alpha$  por macrófagos activados con LPS, modula la actividad de esta citocina sobre la activación endotelial, en particular sobre la traslocación de NF- $\kappa$ B

## OBJETIVO

Determinar si los medios condicionados de macrófagos activados *in vitro* con endotoxina (LPS), inducen una activación endotelial, medida como traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, distinta a la activación producida por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  recombinantes.



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivos celulares

Las células U937, originalmente aisladas de una leucemia humana fueron obtenidas de la American Type Culture Cell Colection (ATCC). Las células fueron crecidas en medio RPMI (In Vitro, México) con 1% de solución antibiótica-antimicótica (GIBCO-BRL) y suplementado con 10% suero fetal bovino (In Vitro, México) ambos previamente inactivados y suplementado con 50  $\mu$ M de sulfato de gentamicina.

Debido a la importancia de realizar este trabajo en un modelo de cultivos primarios, recurrimos a células endoteliales derivadas de vena umbilical humana o HUVECs. Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales humanos colectados en la Unidad de Tococirugía del Hospital de la Mujer del Sector Salud y transportados en solución salina estéril hasta el laboratorio donde fueron procesados según el método reportado en la literatura **(182)**. Una vez adheridas al plato, fueron crecidas en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (In Vitro, México), 1% de glutamina (SIGMA), 20  $\mu$ g/ml de factor de crecimiento endotelial (BTI) y 100  $\mu$ g/ml de heparina (SIGMA).

Las células L929 son fibroblastos murinos originalmente aislados de epitelio de pulmón embrionario, fueron obtenidas de la American Type Culture Cell Colection (ATCC). Las células fueron crecidas en medio MEM (In Vitro, México) con 1% de solución antibiótica-antimicótica (GIBCO-BRL) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (In Vitro, México) previamente inactivado y suplementado con 50  $\mu$ M de sulfato de gentamicina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera de 5% de bióxido de carbono y saturada de humedad. Todas las soluciones empleadas en el cultivo de las células fueron esterilizadas por filtración utilizando filtros de poro de 0.22  $\mu$ m (Millipore, Type GS).

## **Obtención de Medios Condicionados de macrófagos activados por endotoxina**

Con el propósito de obtener Medios Condicionados lo mas limpios posible de endotoxina, desarrollamos un protocolo en el que se realiza la estimulación con endotoxina y 20 min después se retira ésta mediante lavados sucesivos y se sustituye el medio rico por medio sin suplementar. Las células U937 fueron sembradas a una densidad de 500,000 células/ml y estimuladas durante 8 h con PMA 0.1  $\mu$ M (a partir de una solución concentrada 100  $\mu$ M en DMSO 10%). Tras este tiempo, las células son lavadas tres veces consecutivas con PBS y adicionadas con medio RPMI suplementado. Tras 48 h de incubación, tiempo en el que ocurre el proceso de diferenciación hacia monocitos (183), las células son activadas con LPS (SIGMA) a una concentración de 0.1  $\mu$ g/ml. El LPS permanece en contacto con las células durante 20 min, tiempo tras el cual, es retirado casi en su totalidad mediante tres lavados consecutivos con PBS. En este momento, se añade nuevo medio de cultivo libre de suero y de rojo fenol, y las células se incuban durante 3 h contadas a partir del momento del estímulo con LPS. Tras este tiempo el medio se colecta, se centrifuga a 400 g y el sobrenadante es pasado por un filtro de 0.2  $\mu$ m para después ser caracterizado y almacenado a -20°C

## **ELISA**

Como parte de la caracterización bioquímica de los MC, se efectuaron ensayos de ELISA para medir la presencia de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Este ensayo se llevó a cabo utilizando un *kit* comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN), y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se emplearon placas de 96 pozos en los que alícuotas de 50  $\mu$ l del anticuerpo primario (a 2  $\mu$ g/ml) fueron puestas en contacto con 100  $\mu$ l de las muestras experimentales o de la curva patrón. Posteriormente, 1  $\mu$ g de anticuerpo secundario biotinilado (acoplado a streptoavidina-fosfatasa alcalina) a una dilución de 1:1000. Cada pozo fue después adicionado con 100  $\mu$ l del sustrato p-nitrofenyl-fosfato (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) e incubado por 30 min. Posteriormente la D.O fue leída a 450 nm en un lector de ELISA (Biotech Instruments Inc., Winooski, Vt).

## **Geles de acrilamida denaturalizantes para proteína (SDS-PAGE)**

Utilizamos estos geles tanto para caracterizar los MC, tiñéndolos con plata, como para electro-transferirlos a membranas de nitrocelulosa y revelarlas por *western-blot*.

Para cada carril se prepararon 30  $\mu\text{g}$  de proteína que fueron calentados a 95°C durante 5 min en amortiguador de cargado (125 mM Tris-HCl, pH 6.8 1% v/w SDS, 10% v/v glicerol, 0.1% azul de bromofenol, 2% v/v 2-mercaptoetanol) para obtener las proteínas denaturalizadas en solución. Las muestras fueron separadas en un gel al 12% de acrilamida y corridas a 60 V durante 4 h. La preparación del gel involucra una franja de acrilamida de alta densidad en la parte superior, en donde las proteínas se comprimen, para resolverse de manera fina antes de empezar a separarse. Gel compresor: se mezclan 0.65 ml de solución 30 % acrilamida/0.8 % bisacrilamida con 1.25 ml de amortiguador Tris-Cl 0.5M pH 8.8 conteniendo SDS al 0.4% y se agregan 3.05 ml de agua, 50  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio y 10  $\mu\text{l}$  de TEMED. Gel separador: se mezclan 6 ml de solución 30 % acrilamida/0.8 % bisacrilamida con 3.75 ml de amortiguador Tris-Cl 0.5M pH 8.8 conteniendo SDS al 0.4% y se agregan 5.25 ml de agua, 25  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio y 5  $\mu\text{l}$  de TEMED.

### **Tinción con Plata**

En esta técnica el nitrato de plata se precipita en las proteínas presentes en el gel revelándolos con mayor sensibilidad que otros métodos.

Los geles de acrilamida denaturalizantes fueron fijados en 100 ml de una solución de metanol 40%, formalehido 5% durante 10 min en agitación constante. Se les efectuaron dos lavados de 5 min con agua destilada. Posteriormente cada gel fue reducido con 100 ml de una solución de tiosulfato de sodio al 2% (200  $\mu\text{l}$  de la solución concentrada de tiosulfato en 100 ml de agua) durante un minuto en agitación. Se efectuaron al gel tres lavados de 5 min con agua destilada. El gel fué teñido con 100 ml de la solución de nitrato de plata durante 30 min en agitación constante. Se efectuaron al gel tres lavados de 5 min con agua destilada. Se reveló la tinción con 100 ml de solución de revelado. La solución de revelado se cambió según fué necesario mientras se vigilaba

atentamente el gel y cuando aparecieron las bandas se detuvo la reacción inmediatamente para evitar manchas en el gel. La reacción fue detenida con 100 ml de solución de metanol 50%, ácido acético 5%. El gel fue lavado con agua y guardado en una solución de etanol al 10%. Las soluciones utilizadas fueron preparadas como se describe a continuación:

Solución concentrada de tiosulfato: 100 mg de tiosulfato de sodio fueron disueltos en 1 ml de agua destilada.

Solución de nitrato de plata: A 20 ml de hidróxido de sodio al 0.4%, se le agregaron 1.5 ml de hidróxido de amonio. Se le agregó gota a gota y en agitación una solución de 0.8 g de nitrato de plata disuelto en 4 ml de agua. Se aforó a 100 ml.

Solución reveladora: 1.25 ml de ácido cítrico al 1% se mezclaron con 100  $\mu$ l de la solución concentrada de tiosulfato y 100  $\mu$ l de formaldehído al 37%. Se aforó a 100 ml.

## **Ensayo de citotoxicidad**

Este ensayo se efectuó para medir la actividad biológica del TNF- $\alpha$  sobre las células L929, según está reportado en la literatura (184).

Las células L929 fueron crecidas en placas de 96 pozos hasta alcanzar una densidad de  $1.2 \times 10^4$  células/pozo. Para el ensayo, las células fueron incubadas en D-MEM suplementado con 10 % de SFB y 1 mg/ml de actinomicina D (SIGMA, St Louis, Mo) y añadidas con diluciones secuenciales de los MC. Para cada ensayo fue construida una curva patrón con diluciones de rhTNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, Mn) Tras 12 h el medio fue retirado de las células y éstas fueron fijadas con p-formaldehído 4%, y posteriormente teñidas con cristal violeta (0.4 %). Para cuantificar la muerte celular, fue disuelto de cada pozo la tinción con ácido acético al 10 % y la densidad óptica fue leída a 590 nm utilizando un lector de ELISA (Biotech Instruments Inc., Winooski, Vt). El resultado fue expresado como porcentaje de viabilidad comparado con el control sin tratar.

## **Ensayo de Adhesión**

Este ensayo desarrollado en el laboratorio, mide la capacidad de las células HUVECs de establecer uniones firmes mediadas por entidades moleculares, con células en suspensión, en este caso las células U937 que se marcan radioactivamente, lo que permite cuantificar el número total de células que se han adherido a la monocapa endotelial. Previamente en el laboratorio se ha definido que, en condiciones control, la relación del número de células U937 que se une a células HUVECS, es constante en estas condiciones de ensayo.

Las células HUVECs fueron crecidas a confluencia en placas de 48 pozos. Por otro lado las células U937 se marcaron durante 48 h con timidina tritiada [<sup>3</sup>H] (Amersham, Buckinghamshire, UK) con una actividad específica de 1  $\mu$ Ci/ml

El cultivo confluyente de HUVECs fue estimulado por 3 h, ya sea con MC o con citocinas recombinantes y después fueron lavadas con PBS. Posteriormente 1 x 10<sup>5</sup> células U937 marcadas y lavadas, fueron adicionadas a cada pozo de células HUVECs que previamente habían recibido el tratamiento correspondiente. Durante 3h, quedaron las células U937 en contacto con la mono capa endotelial, permitiendo así que se llevase a cabo la adhesión. Las células U937 que no se adhirieron tras este tiempo fueron retiradas mediante tres lavados consecutivos con PBS. Por el contrario, las células adheridas firmemente al endotelio fueron lisadas junto con este con 0.5 ml de NaOH 2M, y la radioactividad remanente fue contada en un contador de centelleo (Beckman LS6000SC, St Louis, Mo). La adhesión fue graficada como el porcentaje de células U937 adherentes con respecto al total de células que inicialmente fueron puestas en contacto con las células HUVECs en cada pozo.

## **Obtención de Extractos Nucleares y Citoplásmicos**

Las células de las que son aislados los factores de transcripción se resuspenden en un amortiguador hipotónico, que aunado a un proceso de congelación facilita el rompimiento de la membrana plasmática. Los núcleos se centrifugan para separarlos del citoplasma y gracias a la acción de una solución de fuerza iónica intermedia, las proteínas asociadas al DNA son removidas sin lisar el núcleo y luego separadas en la fracción soluble.



Se partió de células HUVECs, crecidas al 85-90 % de confluencia. Los cultivos fueron lavados con solución PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) fría y despegadas del plato con espátula de plástico. Se recuperaron en un tubo cónico de 15 ml. Fueron centrifugadas de 5 a 10 min a 375 x g. El sobrenadante (fracción citoplásmica) fue recuperado en amortiguador de congelación 1:1 y guardado para su posterior cuantificación y utilización en ensayos de *western blot*. La pastilla fue congelada en baño de hielo seco y etanol de dos a tres min para romper las células. Una vez congelada, se resuspendió la pastilla suavemente en el 100 µl de amortiguador hipotónico (Hepes 10mM, KCl 10 mM, DTT mM, pH 7.9). El estado de los núcleos fue entonces evaluado con *azul tripano* mezclado en una proporción 1:1. Se centrifugaron en tubos *ependorf* en la microcentrifuga a 4°C durante 10 min a 16,000 x g. Se desechó el sobrenadante. Para extraer las proteínas nucleares, la pastilla resultante fue resuspendida en 30 µl de amortiguador hipertónico (Hepes 20 mM, NaCl 0.4 M, glicerol 25%, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) Sigma, 0.2 mM, Dithiothreitol (DTT) Sigma 1 mM, Fenil-Metil-Sulfonil Fluor (PMSF) 0.5 mM, pH 7.9). Fueron incubadas a 4°C durante 30 min en agitación. Se centrifugaron 20 min a 4°C en la microcentrifuga a 16,000 x g. El sobrenadante fue recuperado y mezclado en una proporción 1:1 con el amortiguador de dilución (Hepes 20 mM, KCl 50 mM, glicerol 20%, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5mM). Se determinó la cantidad proteína obtenida por el método de Bradford utilizando un ensayo comercial (BioRad, Hercules, Ca) y se alicuotó en tubos la cantidad de proteína necesaria para un ensayo de retardo (10 µg). La proteína fue congelada en baño de hielo seco y etanol y almacenada a -70°C. Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo y se utilizaron soluciones frías

### **Fosforilacion de oligonucleótidos**

Se aprovecho la actividad *in vitro* de una polinucleótido-cinasa derivada del fago T4 (T4 PNK), que une covalentemente un [<sup>32</sup>P] al extremo 3' de un oligonucleótido de doble cadena.

Se partió de 200 ng del oligonucleótido a marcar con la secuencia, ya sea del sitio κB canónico (5'AGTTGAGGGGACTTCCAGGC 3') o mutado κB (5'AGTTGAGGCGACTTCCAGGC 3') (Santa Cruz, Sta Cruz, Ca) contenidos en 1



$\mu\text{l}$ , se mezclaron con 0.5 $\mu\text{l}$  de enzima T4 polinucleótido cinasa que equivalen a 5 U (Stratagene), 2.5  $\mu\text{l}$  de amortiguador para la enzima (que provee el mismo fabricante), 3 $\mu\text{l}$  de [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP con una actividad específica de 3000 Ci por mmol, y agua para completar 25  $\mu\text{l}$ . Se incubaron 30 min a 30°C y 15 min a 65°C para inactivar a la enzima. La reacción de marcado fué mezclada con 1 ml de solución de hibridación y posteriormente se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa para eliminar el exceso de [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP no incorporado. La enzima (PNK T4) y el amortiguador utilizados fueron proveídos por Stratagene.

### **Geles de Acrilamida denaturalizantes para DNA**

Para preparar el gel se mezclaron 5.1 g de urea, 1 ml de agua, 1 ml de amortiguador TBE 1X (TBE 10X: 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH 8) y 5 ml de solución acrilamida:bisacrilamida en una proporción 29:1 al 30%. Para polimerizar la mezcla se agregaron 12  $\mu\text{l}$  de Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 25  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio 10 %. Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 con la solución de colorantes (EDTA 20 mM, formamida 95 %, azul de bromofenol 0.05 % y xianol-xileno 0.05 %) se corrieron a 100 V, hasta que los colorantes sobrepasaron la mitad. Los geles fueron expuestos en película fotográfica para obtener un autoradiograma.

### **Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética**

En estos ensayos se aprovecha la interacción específica de los factores de transcripción con una secuencia particular de DNA que previamente se ha marcado radioactivamente. Al resolverlas por electroforesis en un gel de acrilamida no denaturalizante se separaran el DNA unido a proteína, del no unido que corre mas rápidamente

En un tubo *ependorf*, se agregaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína proveniente de los extractos nucleares y se completó con agua a un volumen de 13  $\mu\text{l}$ . Se adicionaron 6  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción (DTT 50 mM, 2% glicerol, Albúmina sérica bovina fracción V (ASB) 20  $\mu\text{g}$ , 50 U de polihexanucleótido (poliHN6), 2  $\mu\text{g}$  de polideoxinosina-deoxicitidina (polidIdC) (ambos de Pharmacia) y 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido fosforilado conteniendo entre 5000 y 10 000 cpm. Se incubó la

reacción a temperatura ambiente durante 20 min para permitir la formación de complejos DNA-proteína. En caso de ensayos de competencia con oligonucleótido o fragmento no marcado, este se puso a incubar, 15 min antes de adicionar el DNA marcado. La reacción se detuvo adicionando 6  $\mu$ l de colorante (ficoll 45, 15 % azul de bronofenol 0.25% y xianol xileno 0.25%). Se cargaron las reacciones en un gel de acrilamida:bisacrilamida no denaturalizante al 7.5% que fué corrido a 150 V hasta que los colorantes alcanzaron la mitad del gel. El gel fue puesto a secar y luego expuesto, ya sea en película fotográfica para obtener una auto radiografía o en pantalla de fosforimetro para luego ser revelada o leída.

### **Electrotransferencia y ensayo de *Western Blot***

Los geles denaturalizantes fueron sometidos a electro-transferencia en húmedo hacia membranas Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Las membranas transferidas fueron incubadas con anticuerpos dirigidos contra las isoformas de I $\kappa$ B humanas: I $\kappa$ B- $\alpha$  (C-21) I $\kappa$ B- $\beta$  (C-20), I $\kappa$ B- $\epsilon$  (M-121) ó contra la subunidad p65 (sc-109) (Sta. Cruz, Sta Cruz, Ca) diluidas 1:500 en amortiguador TBS. Después de ser lavadas con leche descremada al 5 %, fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa dirigido contra inmunoglobulina de conejo (GIBCO/BRL, Galtherburg, Md) o de ratón (PIERCE, Rockford, Il). La membrana fue lavada para retirar el exceso de anticuerpo secundario y la señal fue revelada por quimio-luminiscencia utilizando para este propósito un sistema comercial (Supersignal system PIERCE, Rockford, Il). La señal expuesta en una película fotográfica, fue normalizada contra la cantidad de proteína total cargada en cada carril, gracias a la tinción con azul de coomasie de una porción no transferida del gel.

### **Análisis estadístico**

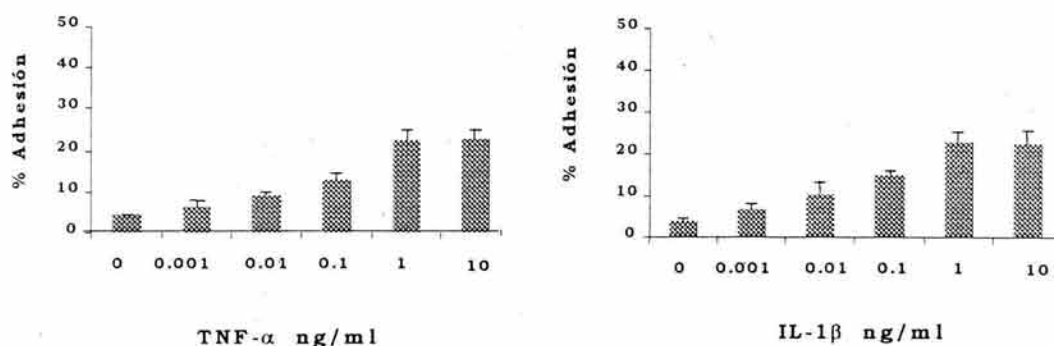
Todos los ensayos de adhesión son reportados como el promedio de 3 a 5 ensayos realizados de manera independiente, cada uno por triplicado. Las barras de error en las gráficas indican el *error estándar*. Los datos fueron además analizados con una prueba de *t student* y se señala la significancia estadística.

## RESULTADOS

### La respuesta de las células endoteliales a citocinas inflamatorias recombinantes

Los cultivos primarios de células endoteliales han sido estandarizados en el laboratorio y se ha verificado mediante distintas técnicas el grado de pureza que presentan con respecto a otros tipos celulares. Estas células se denominan HUVECs y pueden mantenerse proliferando *in vitro* entre tres y cuatro semanas. Todos los experimentos que se presentan, fueron realizados con células entre el segundo y el cuarto pase y una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia de entre el 90 y el 100%.

Como primer paso se llevó a cabo la caracterización de la respuesta de las células HUVECs a las dos principales citocinas recombinantes reportadas en la literatura: TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ . Esta caracterización consistió en la medición de la capacidad de adhesión de células U937 y en la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B utilizando ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA)



**Figura 7.- Citocinas recombinantes inducen un aumento en la capacidad de Adhesión de células HUVECs que se satura a 1ng/ml de citocina.**

Ensayo de Adhesión con cantidades crecientes de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  recombinantes. Se grafica el porcentaje de adhesión que equivale a la proporción de células que presentaron adhesión firme con respecto al total que fueron puestas en contacto con la monocapa endotelial.

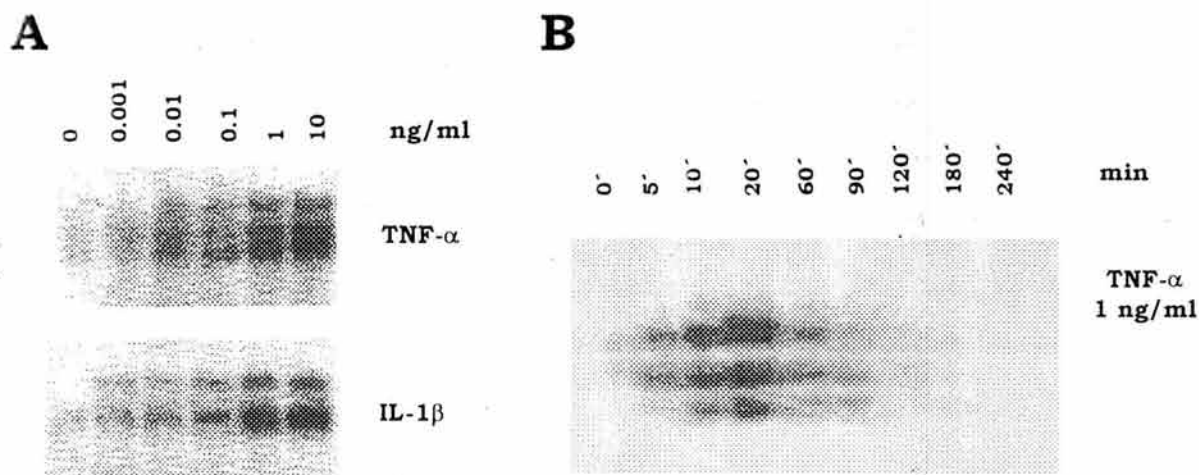
## **La adhesión alcanza saturación a 1ng/ml de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

Como está reportado en la literatura, el aumento en la capacidad de adherir células en suspensión aumenta proporcionalmente al estímulo.

Desde dosis muy pequeñas de citocina, la célula endotelial aumenta su capacidad de adhesión (Figura 7). Es importante notar que a concentraciones de 1 ng/ml tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$  la respuesta alcanza un máximo, incluso utilizando concentraciones de 10 ng/ml el porcentaje de adhesión permanece entre un 20 y un 25 %.

Como se ha mencionado, la adhesión es un fenómeno que depende directamente de la expresión transcripcional de las moléculas de adhesión. Por esta razón y porque la activación endotelial esta directamente relacionada a la traslocación de NF- $\kappa$ B, es que medimos su presencia en el núcleo en respuesta a TNF- $\alpha$  y a IL-1 $\beta$ .

(Ver figura 1B y 1C, Anexo 4: Artículo NF- $\kappa$ B traslocation and endotelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Lopez-Bojorquez, etal.)



**Figura 8.- Las citocinas recombinantes inducen traslocación de NF- $\kappa$ B en células HUVECs. Ensayos de retardo de movilidad electroforética.**

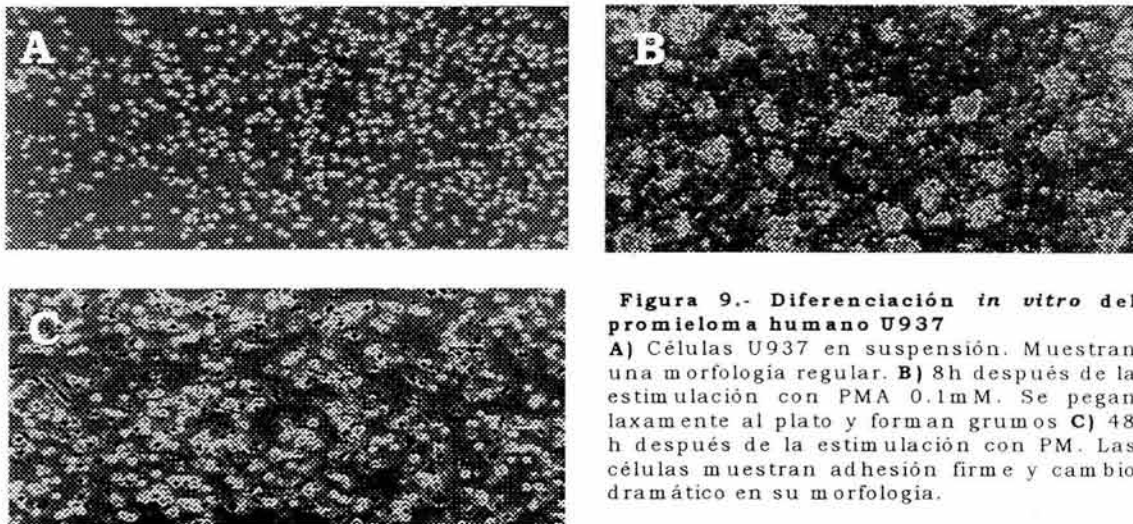
**A)** Curso temporal. Traslocación de NF- $\kappa$ B a tiempos cortos de estimulación con 1 ng/ml de TNF- $\alpha$  recombinante **B)** Dosis-respuesta. Traslocación de NF- $\kappa$ B a dosis crecientes de TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  recombinantes (se señalan con flechas los complejos que se forman en núcleos de células HUVECs complejos I, II, y III)

## **La activación endotelial deriva de la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo**

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B fue medido por ensayos tipo EMSA en extractos nucleares de células HUVECs. La estimulación con cantidades crecientes de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  recombinantes induce una traslocación, dosis dependiente que alcanza el techo de saturación a concentraciones de 1 ng/ml tanto para TNF- $\alpha$  como para IL-1 $\beta$ . Como ocurre con la traslocación, por encima de esta concentración de citocina, no se alcanzan mayores niveles de NF- $\kappa$ B en el núcleo (Figura 8 A)

## **Los medios condicionados de macrófagos activados por endotoxina**

Con el propósito de mimetizar lo que hemos llamado el contexto de factores inflamatorios que son co-secretados con el TNF- $\alpha$ , desarrollamos un modelo que nos permitiera emular *in vitro* este complejo conjunto de factores. Como se discutirá mas adelante, si bien nos permiten aproximarnos al objetivo, los resultados obtenidos deben ser interpretados con cautela.



**Figura 9.- Diferenciación *in vitro* del promieloma humano U937**

**A)** Células U937 en suspensión. Muestran una morfología regular. **B)** 8h después de la estimulación con PMA 0.1 $\mu$ M. Se pegan laxamente al plato y forman grumos **C)** 48 h después de la estimulación con PM. Las células muestran adhesión firme y cambio dramático en su morfología.

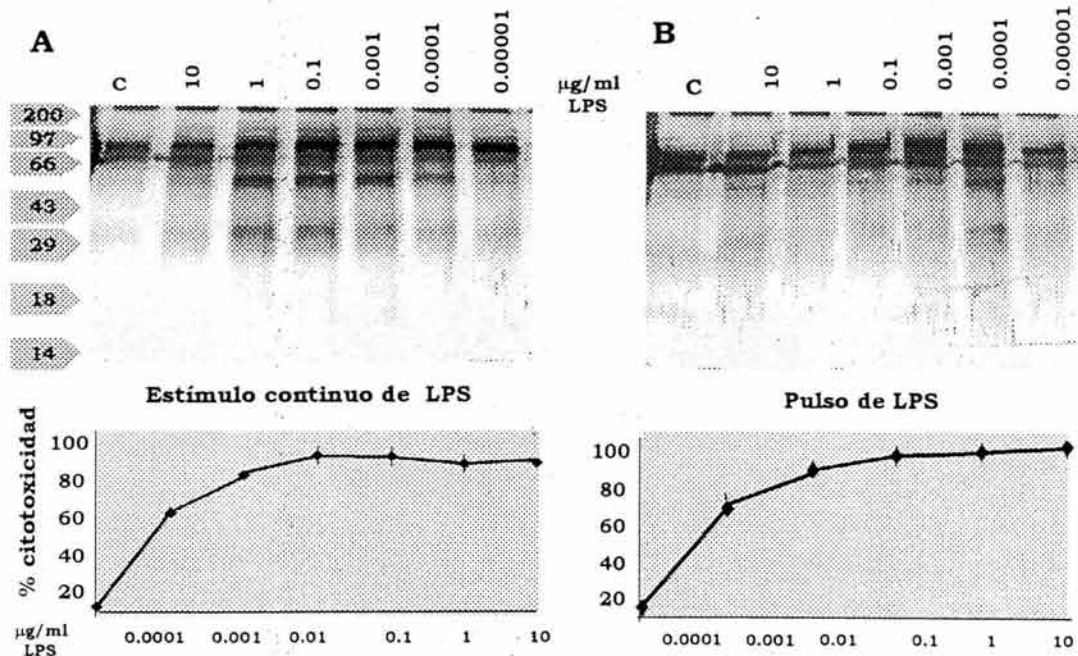


## ***El protocolo de diferenciación y activación in vitro de un promieloma humano***

La línea celular U937 se deriva de un promieloma humano y para nuestros fines modificamos de la literatura el protocolo de diferenciación y activación *in vitro*. Esta línea celular crece en suspensión con relativa facilidad y presenta marcadores de precursor mieloide (lizosima, transglutaminasa tisular) **(185, 186)**. El PMA mimetiza efectos celulares que inducen diferenciación y las células comienzan un programa que incluye cambios morfológicos claramente visibles y modificaciones a nivel molecular que han sido bien documentados **(187)**. Estimulando a las células con 0.1 $\mu$ M de PMA, las células presentan a las pocas horas adhesión laxa que se manifiesta como unión ligera a plástico y formación de grumos de la suspensión celular. Al retirar el PMA tras 8 h de estimulación se evita la desensibilización de las PKC's celulares y se permite la continuación del programa de diferenciación. Después de 48 h, las células presentan adhesión firme al plástico y han desarrollado procesos de extensión celular (Figura 9). Sólo hasta este momento son receptivas a la activación con endotoxina.

Para determinar la cantidad mínima de endotoxina requerida para obtener activación mieloide, realizamos dos protocolos de dosis respuesta con LPS. Uno de ellos consistió en estimular con LPS a las células diferenciadas, y retirar la endotoxina 20 min después de la estimulación realizando tres lavados consecutivos con PBS y sustituyendo el medio con RPMI sin suero. El medio se colecta 3 h después de la estimulación y a este le llamamos *pulso con LPS*. El otro protocolo consiste simplemente en estimular con la dosis indicada de endotoxina y colectar el medio al tiempo indicado sin haber retirado el LPS del medio, a este otro protocolo le llamamos *estímulo continuo de LPS*. Con el segundo protocolo se obtiene medio condicionado que contiene el LPS con el que se estimulan las células, con el primero el medio obtenido contiene solamente trazas de LPS que en principio no interferiría con la activación endotelial. La actividad biológica de los medios condicionados fue determinada mediante ensayos de citotoxicidad en células L929. Así determinamos que a concentraciones muy bajas de LPS (desde 0.0001  $\mu$ g/ml) se obtiene activación mieloide suficiente para inducir la producción de cantidades importantes de TNF- $\alpha$  (70% de citotoxicidad).

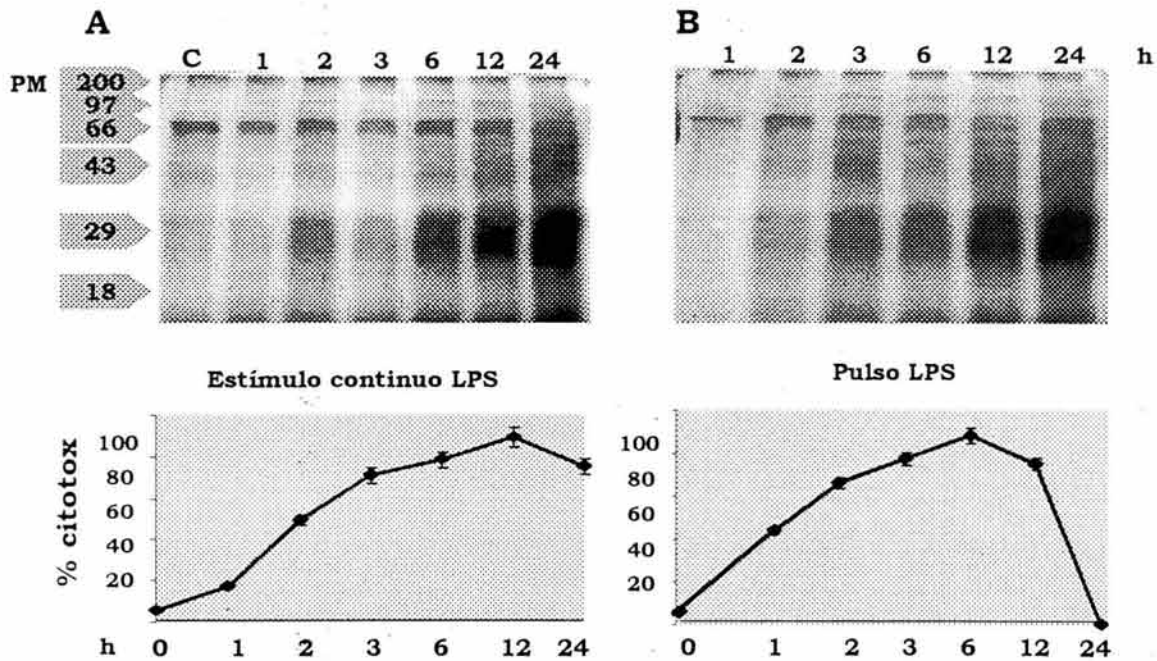




**Figura 10.- El LPS induce activacion mieloide desde dosis muy bajas.**

Gel denaturalizante teñido con plata de los medios condicionados colectados a 3 h de estimulación con las dosis indicadas de LPS. En el panel inferior se muestra la inducción de citotoxicidad de estos MC. Esta representa la actividad biológica de TNF- $\alpha$ .

A) Estimulo continuo de LPS B) Pulso de LPS



**Figura 11.- El LPS induce activacion mieloide de manera transitoria.**

Gel denaturalizante teñido con plata de los medios condicionados colectados a 3 h de estimulación con las dosis indicadas de LPS. En el panel inferior se muestra la inducción de citotoxicidad de estos MC. Esta representa la actividad biológica de TNF- $\alpha$ .

A) Estimulo continuo de LPS B) Pulso de LPS

Por otro lado, el análisis electroforético de los medios obtenidos reveló que el patrón de distribución protéica, cambia solamente en ciertos rangos de peso molecular (Figura 10). Así determinamos que una vez diferenciadas a monocitos, era posible activar a las células U937 con 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS.

Para determinar la cinética de secreción de  $\text{TNF-}\alpha$  después de la activación, colectamos los medios condicionados a distintos tiempos tras la adición con LPS utilizando el protocolo de *estímulo continuo* y de *pulso de LPS*. La actividad biológica del  $\text{TNF-}\alpha$  (% citotoxicidad) presenta un pico después de las 3 h de estimulación, después comienza a decaer, antes en el caso del protocolo de *pulso de LPS* (Figura 11).

Para conocer, no solo la actividad biológica, sino también la cantidad en masa de citocinas que presentan los obtenidos con el protocolo de *pulso de LPS* MC, realizamos mediciones por ELISA tanto de  $\text{TNF-}\alpha$  como de  $\text{IL-1}\beta$  (Figura 12).

Si bien la cinética de producción es diferente para ambas citocinas, es importante notar que tras 3 h de activación con LPS, la masa producida de ambas tiene un valor aproximado a 1  $\text{ng}/\text{ml}$ , cantidad equivalente a la dosis con la que se alcanza el techo de saturación en la adhesión de células HUVECs

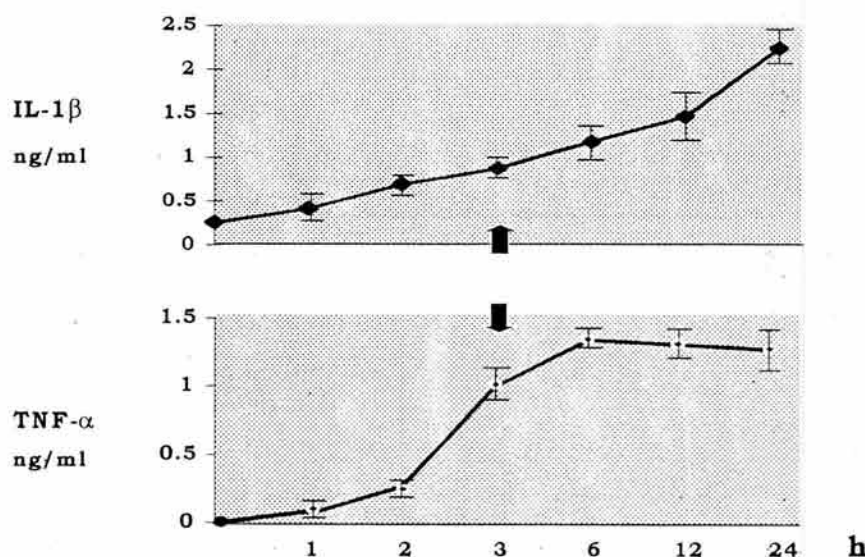


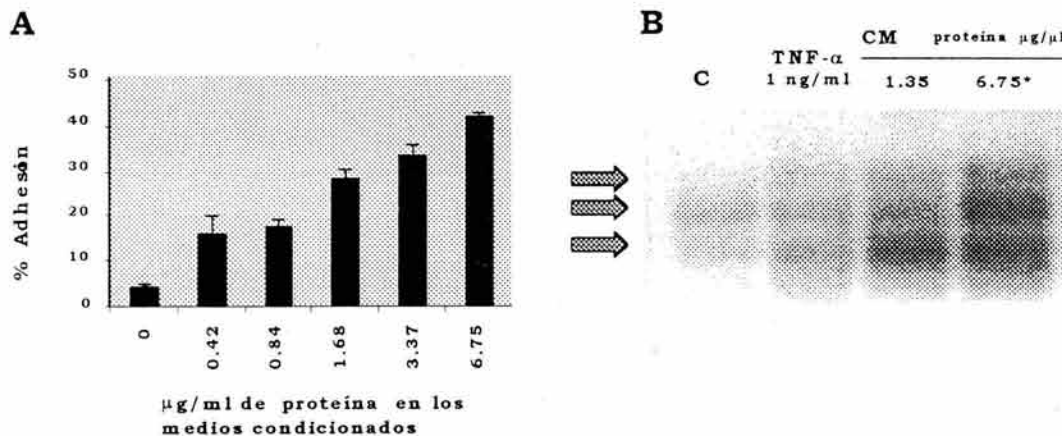
Figura 12.- Medición de citocinas por ELISA en Medio Condicionado. La cinética de secreción de  $\text{IL-1}\beta$  y de  $\text{TNF-}\alpha$  tras el pulso con LPS

Con estos resultados, se prepararon lotes grandes de medios condicionados con el protocolo de *pulso de LPS* y colectados 3 h después de la estimulación con 0.1 µg/ml de LPS. Todos los resultados que se muestran en adelante son MC obtenidos y caracterizados de esta forma.

En este punto resulta importante dejar claro que si bien las U937 no son monocitos primarios, nos permiten acceder con bastante cercanía a lo que hemos llamado contexto de factores pro-inflamatorios co-secretados con TNF-α.

## Los Medios Condicionados inducen un aumento en la capacidad de adhesión y en la traslocación de NF-κB, por encima de la saturación obtenida con citocinas recombinantes

Las células HUVECs al ser estimuladas con MC en dosis equivalentes a 1 ng/ml de TNF-α, en actividad biológica presentan una activación superior a la que caracterizamos con TNF-α recombinante. La adhesión alcanza valores de 45% y la traslocación de NF-κB aumenta 5.68 veces comparado con el aumento de 2.44 veces que induce TNF-α (Figura 13). Es importante notar que, como ocurre con la estimulación con citocinas recombinantes, el aumento en la adhesión correlaciona con los niveles de NF-κB observados en el núcleo.

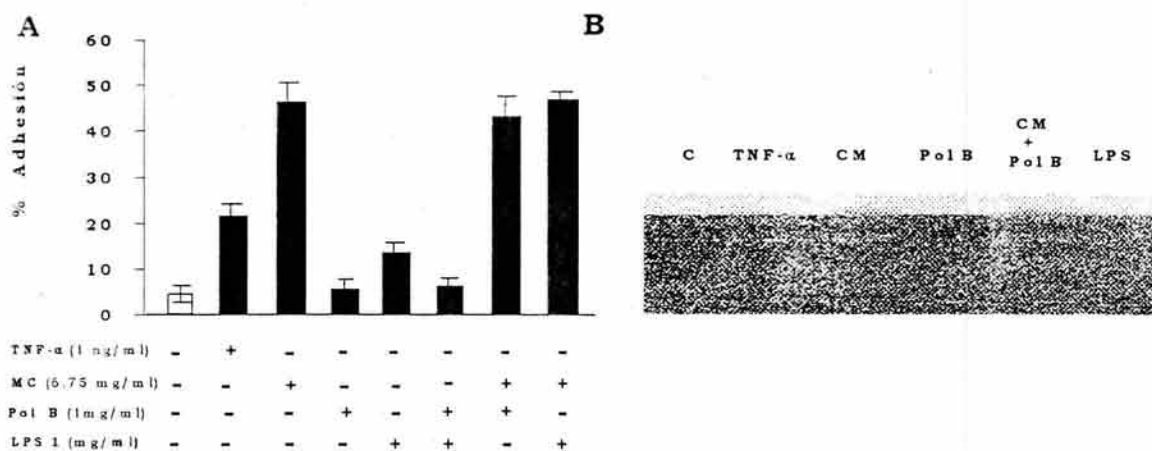


**Figura 13.- Los medios condicionados inducen aumento en el porcentaje de adhesión y traslocación de NF-κB por encima de la obtenida con dosis saturantes de TNF-α recombinante.**

**A)** Ensayo de Adhesión. Las células HUVECs se estimularon con cantidades crecientes de Medio Condicionado. La actividad biológica de TNF-α presente en 6.75 µg/ml de proteína corresponde a 1 ng/ml de TNF-α. **B)** Ensayo de retardo de movilidad electroforética. Las flechas indican los complejos de NF-κB que se traslocan al núcleo de células HUVECs

### ***El LPS remanente en los MC no es el responsable del efecto de potenciación observado***

Una vez que las células U937 se han diferenciado, son activadas con LPS a concentraciones de 0.1  $\mu$ g/ml. Este LPS es retirado de las células adheridas mediante tres lavados consecutivos con PBS, sin embargo, no se puede descartar la presencia de LPS que podría ocasionar activación endotelial interfiriendo así con la interpretación del fenómeno observado. Por esta razón incluimos un ensayo de adhesión en el que el MC fue pre-incubado con Polimixina B antes de ser puesto en contacto con las HUVECs (Figura 14). La Polimixina B inhibe la actividad del LPS al mimetizar la acción de la proteína acarreadora LBT, impidiendo así su unión al co-receptor CD14 (188).



**Figura 14.- El LPS remanente en los MC no ocasiona el efecto de potenciación observado por efecto de los MC.**

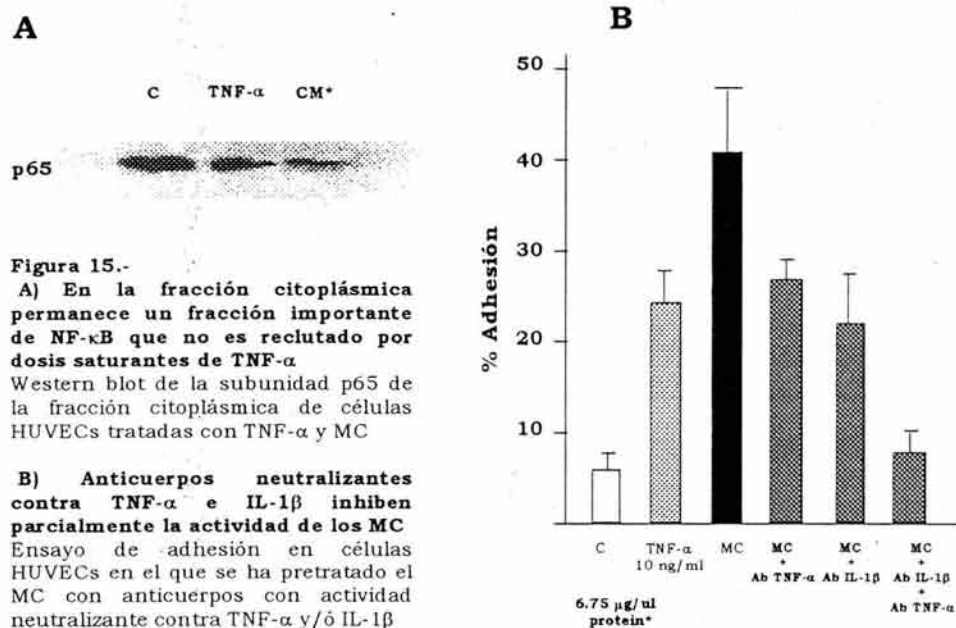
**A)** Ensayo de adhesión de HUVECs estimuladas con MC previamente incubado con polimixina B.  
**B)** Ensayo tipo EMSA de HUVECs estimuladas con MC previamente incubado con polimixina B.

### ***Anticuerpos neutralizantes dirigidos contra TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no abaten por completo la actividad de los MC***

Con el propósito de identificar el nivel de participación que juegan las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la activación endotelial mediada por MC, se utilizaron anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos son capaces de inhibir la actividad

biológica de la citocinas contra las que están dirigidos, al capturarlas específicamente en solución e impedir la unión a su receptor celular. Los MC se incubaron en presencia de los anticuerpos durante 1h. Previamente en el laboratorio se llevó a cabo la calibración con curvas de citocinas recombinantes, que permitió determinar la cantidad de anticuerpo necesaria para neutralizar 1ng/ml tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$  (2  $\mu$ g/ml). Los resultados obtenidos (Figura15) muestran que al inhibir la actividad tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$ , la respuesta en la adhesión no se abate por completo, de hecho, la actividad que permanece es equivalente a la obtenida con alguna de las dos citocinas recombinantes, es decir, igual a la observada tras la estimulación ya sea de TNF- $\alpha$  o de IL-1 $\beta$ . De manera interesante, al preincubar los MC con ambos anticuerpos neutralizantes no se observa un aumento en el porcentaje de adhesión que sea estadísticamente distinto al control.

(Ver figura 1A, Anexo 4: Artículo **NF- $\kappa$ B traslocation and endotelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$**  López-Bojorquez, etal.)



### ***La traslocación de NF- $\kappa$ B inducida por MC se sostiene durante más tiempo que la inducida por TNF- $\alpha$***

No solamente los niveles de NF- $\kappa$ B encontrados en el núcleo son más elevados al estimular a las células HUVECs con MC, de manera interesante

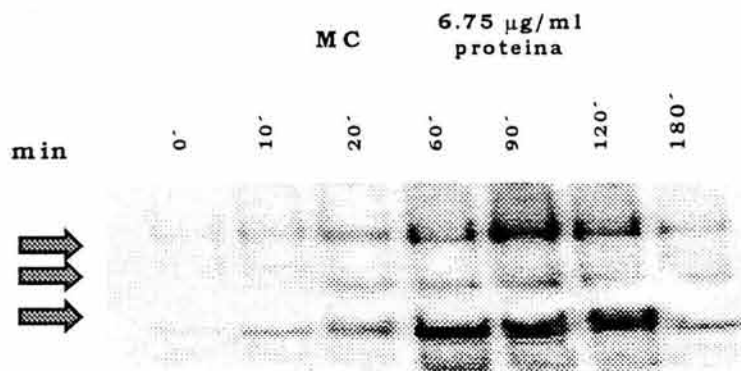


encontramos que la presencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo se mantiene por más tiempo (Figura 16) La incubación con MC induce una traslocación de NF- $\kappa$ B también transitoria, pero que tiene un pico a los 60 min y que se mantiene por mas tiempo que la observada con TNF- $\alpha$ . También la presencia del factor en el núcleo disminuye con el tiempo de manera que después de 2 h de estimulación con MC prácticamente se ha abatido por completo.

***En respuesta a MC se traslocan al núcleo las mismas subunidades de NF- $\kappa$ B que en respuesta a TNF- $\alpha$***

Los análisis de *supershift*, revelaron que los complejos de NF- $\kappa$ B que se traslocan al núcleo en HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  son equivalentes a los que se observan tras la estimulación con MC. Si bien la intensidad de los complejos es mayor, lo que denota mayor cantidad de proteína unida al oligonucleótido marcado, el reconocimiento con anticuerpos dirigidos contra distintos miembros de la *familia Rel* indica que las diferencias son cuantitativas y no cualitativas (Figura 17).

(Ver figura 5, Anexo 4: Artículo **NF- $\kappa$ B traslocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$**  López-Bojorquez, etal)



**Figura 16.- Los medios condicionados inducen una traslocación sostenida y continúa de NF- $\kappa$ B. Ensayo de retardo de movilidad electroforética de NF- $\kappa$ B en células HUVECs.**

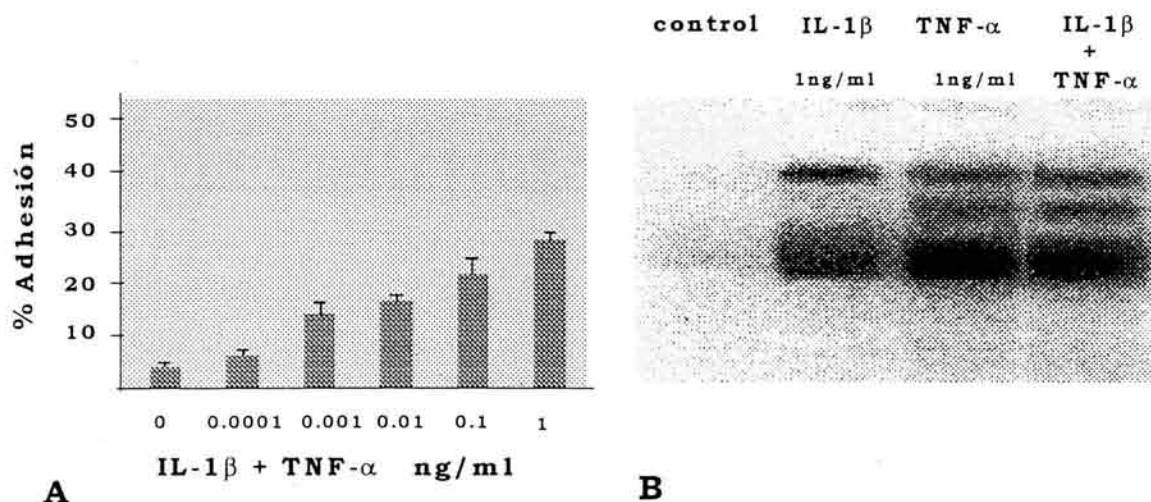
Las células se estimularon con la cantidad de medio condicionado que se indica. La actividad biológica de TNF- $\alpha$  presente en 6.7 mg/ml de proteínas de medio condicionado equivale a 1 ng/ml de TNF- $\alpha$  recombinante.



## **La combinación de citocinas inflamatorias recombinantes no es capaz de reproducir el efecto de los MC**

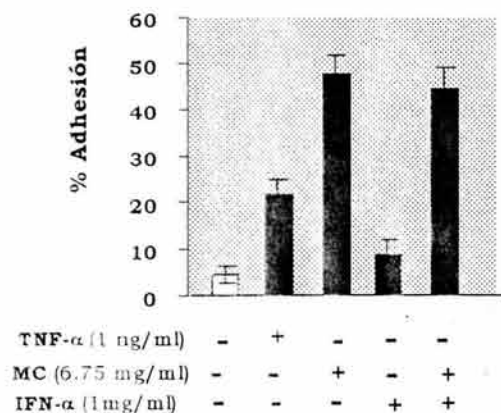
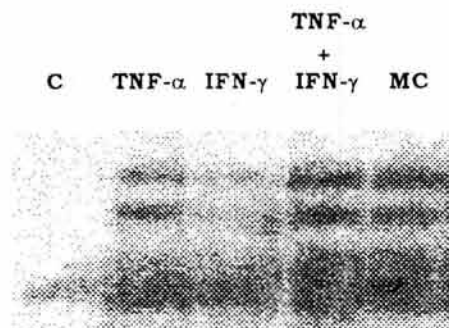
Debido a que los MC no son otra cosa que una mezcla de factores pro-inflamatorios, decidimos estimular a las HUVEC simultáneamente con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . El aumento en la capacidad de adhesión evocada en la célula endotelial, no aumenta con la mezcla de ambas citocinas. Por otro lado, la traslocación de NF- $\kappa$ B tampoco se ve afectada tras la estimulación simultánea (Figura 18). Es interesante notar que el patrón de complejos que se induce en el núcleo celular en las HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  y con IL-1 $\beta$  simultáneamente es el mismo que se observa sólo con la estimulación de TNF- $\alpha$ .

Sin embargo existe una combinación de citocinas que puede mimetizar la respuesta mediada por los MC: Como se ha mencionado la literatura reporta que el IFN- $\gamma$  es capaz de sinergizar y/o potenciar el efecto del TNF- $\alpha$  en distintos fenómenos celulares del sistema inmune. Por esta razón decidimos estimular simultáneamente a las HUVEC con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Esta combinación ejerce un efecto en la traslocación de NF- $\kappa$ B y en la capacidad de adhesión cuantitativamente muy similar al que se observa en respuesta a los MC (Figura 19)



**Figura 18.- La estimulación simultanea con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no produce un incremento en los niveles de adhesión o en la traslocación de NF- $\kappa$ B mayor al que producen las citocinas recombinantes por separado.**

**A)** Ensayo de adhesión con cantidades crecientes de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  añadidas simultaneamente **B)** Ensayo tipo EMSA de NF- $\kappa$ B en células HUVECs estimuladas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  añadidas simultaneamente o por separado..

**A****B**

**Figura 19.- Las estimulación simultanea de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  es capaz de reproducir la activación endotelial inducida por los MC**

A) Ensayo de adhesión B) Ensayo tipo EMSA

Las células fueron tratadas con 1ng/ml de TNF- $\alpha$ , 100 U/ml de IFN- $\gamma$  o ambos simultaneamente. O bien con 6.75  $\mu$ g/ml de proteína de MC. Los extractos nucleares se colectaron 20 min tras el estímulo.

## ***Los Medios Condicionados reclutan una poza alternativa de NF- $\kappa$ B***

Los resultados mostrados hasta este momento, sugieren con la existencia de una poza de NF- $\kappa$ B que ya no es sensible al efecto de citocinas recombinantes y, que, sin embargo, tienen acceso los MC. Para tratar de sondear acerca el posible origen de esta población adicional de NF- $\kappa$ B utilizamos inhibidores de vías de transducción involucradas con la activación de este factor y decidimos explorar la degradación de las distintas isoformas de I $\kappa$ B que según la literatura podrían estar involucradas.

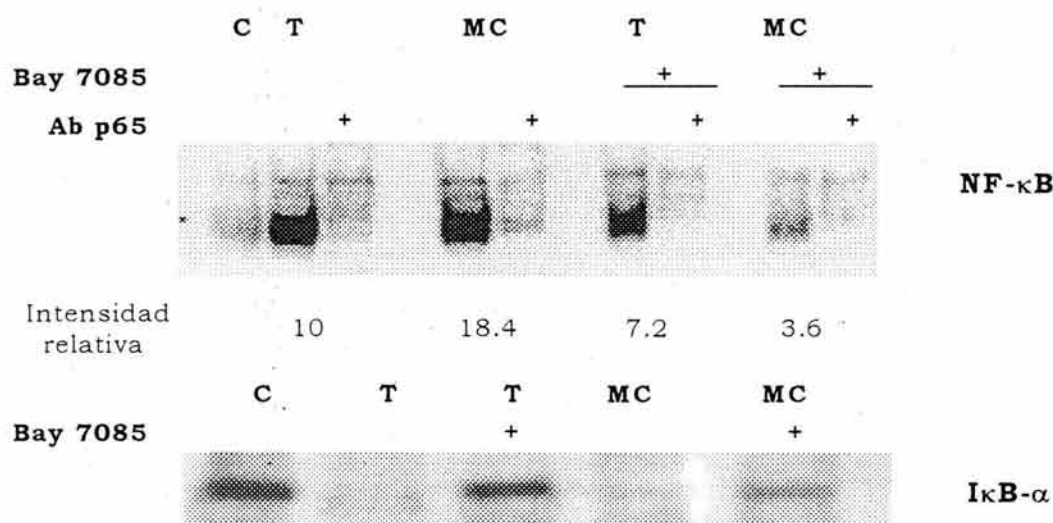
## ***El inhibidor BAY-117085 no bloquea por completo la vía activada por los MC***

La vía de transducción activada por TNF- $\alpha$ , involucra la degradación de la isoforma I $\kappa$ B- $\alpha$ . Por esta razón utilizamos el inhibidor específico BAY-117085, bloqueador específico de la actividad de IKK- $\beta$  (189). Con esto esperamos

determinar en que medida, la señal inducida por los MC que viaja a través de NF- $\kappa$ B. La detección de NF- $\kappa$ B en el núcleo es un claro indicio de que el inhibidor Bay-117085 no bloquea completamente la traslocación de NF- $\kappa$ B dependiente de MC, pero induce, sin embargo, una inhibición total del fenotipo inducido por el TNF- $\alpha$ . Este resultado nos llevó a medir cómo ocurre la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , en HUVECs bajo el estímulo de TNF- $\alpha$ , MC y probando el efecto de BAY-117085 sobre ambos estímulos. Como sucede con la traslocación de NF- $\kappa$ B, si bien el inhibidor bloquea la acción de TNF sobre la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , no ocurre así con la degradación mediada por MC (Figura 20).

### **La estimulación con MC induce una degradación mas rápida de las distintas isoformas de I $\kappa$ B**

El resultado obtenido con BAY-117085, un inhibidor específico de la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  nos llevó a medir la desaparición de las otras isoformas de I $\kappa$ B que según la literatura podrían estar involucradas en la traslocación de NF- $\kappa$ B que ocurre en respuesta a estímulos inflamatorios.

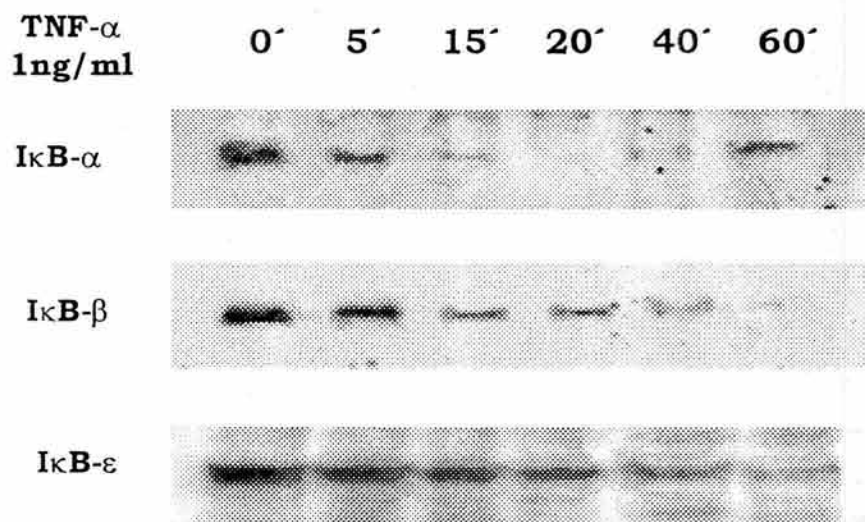


**Figura 20.- El inhibidor BAY-7085 no bloquea completamente la traslocación de NF- $\kappa$ B ni la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  en respuesta a MC.**

**A)** Ensayo de retardo en HUVECs tratadas con MC (6.75  $\mu$ g/ml de proteína), TNF- $\alpha$  (1ng/ml) y Bay 7085 10  $\mu$ M. El inhibidor fue añadido a las células 2 h antes de la estimulación con citocina recombinante o con MC. **B)** Western Blot de I $\kappa$ B- $\alpha$  en extractos citoplásmicos de HUVECs tratadas con TNF- $\alpha$  y CM. La proteínas tanto nucleares como citoplásmicos fueron colectadas 20 min tras el estímulo.

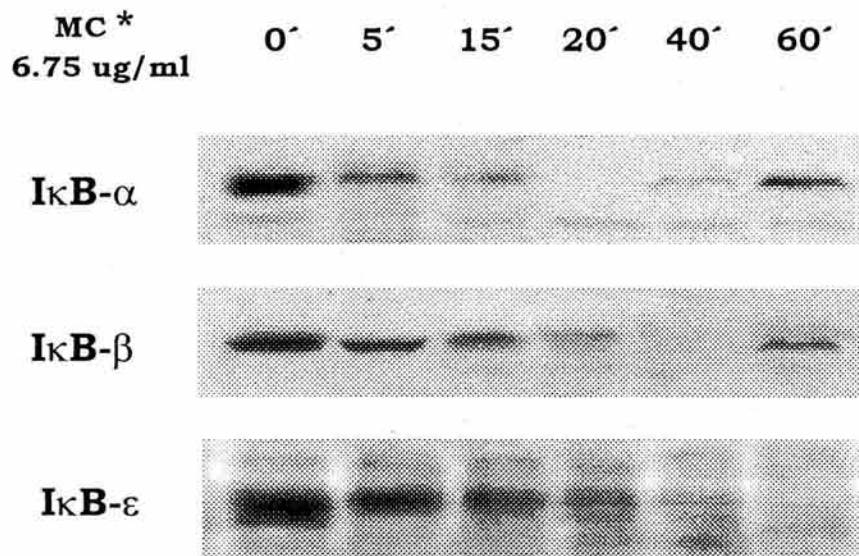
Con este proposito utilizamos un *western blot* para cuatificar la presencia de I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  en extractos citoplásricos de HUVECs en respuesta a TNF- $\alpha$  y MC. La respuesta encontrada tras la estimulación con TNF- $\alpha$  es coherente con lo reportado en la literatura, en el sentido de la rápida degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , seguida de la degradación secuencial de las isoformas  $\beta$  y  $\epsilon$ . La síntesis de novo de I $\kappa$ B- $\alpha$  puede empezar a observarse después de 60 min de estimulación (Figura 21). Por otro lado, la estimulación de HUVECs con MC promueve una degradación mayor y más rápida de las tres isoformas (Figura 22), particularmente de I $\kappa$ B- $\epsilon$ , lo cual resulta congruente con la presencia sostenida de NF- $\kappa$ B que se observa en el núcleo en respuesta a MC.

(Ver figura 6, Anexo 4: Artículo NF- $\kappa$ B traslocation and endotelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Lopez-Bojorquez, et al.)



**Figura 21.- Las distintas isoformas de I $\kappa$ B se degradan de manera secuencial en respuesta a TNF- $\alpha$**

*Western blot* de I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ , en extractos citoplásricos de HUVECs tratadas con TNF- $\alpha$ . La proteínas fueron colectadas a distintos tiempos tras el estímulo.



**Figura 22.- Las distintas isoformas de IκB se degradan de manera secuencial en respuesta a MC**

Western blot de IκB-α, β y ε, en extractos citoplásmicos de HUVECs tratadas con MC. La proteínas fueron colectadas a distintos tiempos tras el estímulo.

\* Actividad biológica equivalente a 1ng/ml de TNF-α

# DISCUSIÓN

## ¿Porque el modelo de Medios Condicionados?

A pesar de que el estudio de la respuesta inmune innata comenzó a conceptualizarse desde hace más de un siglo, ha seguido la vía marcada por el desarrollo técnico de nuevas metodologías. Se caminó así por la imagen morfológica y fenotípica de patologías infecciosas, la descripción de la respuesta inflamatoria, el descubrimiento de la infiltración celular, la purificación de los factores solubles participantes, la lucidación de las vías celulares que estos encienden, y la descripción molecular de la expresión génica que se esconde detrás del evento fisiológico.

En materia de biología celular del sistema inmune, hay eventos que determinaron adelantos significativos. Dos buenos ejemplos que en los últimos 30 años permitieron un progreso sustancial en el entendimiento de mecanismos inmunes son, por un lado, el desarrollo de cultivos celulares (182) y por otro la purificación de citocinas (99). Las citocinas se han definido como hormonas protéicas que son producidas generalmente por células del sistema inmune y que regulan distintos procesos relacionados con activación, diferenciación, muerte, migración y proliferación celular entre otros.

La purificación de éstas y otros factores proteicos a partir de medios condicionados y/o de sobrenadantes de distintos tipos celulares, o de distintas preparaciones de suero sanguíneo, se llevó a cabo en su mayoría en los años ochentas (190). Esto trajo consigo el estudio de las propiedades individuales de cada factor (191). Después, el uso de factores recombinantes permitió diseccionar las funciones que cada elemento activan por separado y las unidades bioquímicas que participan en su actividad (192). Se pudo así determinar, cual de cada una de las citocinas dentro del contexto, regulaba que actividad celular. En este sentido, en los pasados 20 años se descubrieron muchos de los mecanismos que subyacen a la biología de los factores solubles gracias al manejo de factores recombinantes: se identificaron y clonaron las proteínas membranales de unión específica, o



receptores, se caracterizaron en su mayoría las vías de transducción que median la respuesta celular, se realizaron intensos estudios farmacológicos relacionados con sus efectos *in vivo*, etc.

Los cultivos de células primarias son un modelo que proporciona respuestas de alguna manera extrapolables a los fenómenos que ocurren *in vivo*. Permiten también la purificación y/o fraccionamiento de proteínas celulares, su fácil visualización, el uso de fármacos con efectos inhibidores e incluso la manipulación genética de las células. Los cultivos celulares permitieron visualizar los efectos moleculares específicos de los factores purificados. Prácticamente toda la bioquímica y la biología celular del sistema inmune se ha llevado a cabo con cultivos celulares y utilizando factores recombinantes.

Con estas herramientas se ha entendido el efecto de distintas citocinas sobre la activación, proliferación y actividad de linfocitos y otras células inmunes. Por otro lado ha quedado claro que el sistema inmune constituye una compleja red de interacciones entre productos solubles y células. Ahora podemos preguntarnos ¿Cómo interactúan entre sí los distintos factores que son secretados simultáneamente al torrente sanguíneo? ¿El contexto co-secretado junto con cada factor, tiene efecto en la célula blanco? ¿Cómo influye este contexto en la modulación de un fenómeno en particular? Utilizando para ello herramientas moleculares que nos permiten explorar más a fondo las consecuencias de estas interacciones.

El modelo de MC que desarrollamos, nos ha permitido acercarnos a vislumbrar las interacciones que *in vivo* logran tener las citocinas y los factores inflamatorios que son secretados por macrófagos activados por endotoxina. Nos ha permitido entender el tipo de regulación que subyace a la actividad de las citocinas inflamatorias clásicas, como el TNF- $\alpha$  y como pueden ejercer los factores que se secretan en conjunto con este, efecto sobre su actividad. Por otro lado, el uso de los MC nos permiten acceder no solo a la composición del contexto, sino a la proporción en la que son secretados *in vivo* los factores y, por lo tanto, la proporción en la que son presentados a la célula blanco (98). En este sentido, el sistema endotelial es, además, el blanco primario de la gran mayoría de las

señales que son producidas por el sistema inmune. En otros estudios, MC similares han sido utilizados para estimular células HUVECs (193)

En este momento, el estudio de la red de citocinas, de las vías de factores de transcripción, y de las interacciones celulares está en un punto en que requiere de la integración de la gran cantidad de conocimiento acumulado con modelos *in vitro* (194).

### **Las U937 son diferenciables *in vitro* hacia el linaje mieloide**

Las células U937 fueron descritas originalmente en 1985. Se trata de una leucemia humana caucásica con diversos marcadores linfoides (195). Han sido caracterizadas como promielocitos que pueden diferenciarse hacia monocitos bajo la estimulación con PMA, o hacia granulocitos cuando son expuestas a DMSO (114). Una vez diferenciadas, presentan marcadores mieloides y responden a endotoxina. En estas células se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la producción de citocinas inflamatorias y de la regulación genética que subyace a su secreción (113) así como análisis de las funciones de células mieloides (187) características que adquieren después del protocolo de diferenciación.

A pesar de que el protocolo de diferenciación a linaje mieloide de las U937 está bien caracterizado en la literatura, el hecho de que los productos de secreción se colecten tras la estimulación con LPS puede dificultar la interpretación. Se definió el tiempo mínimo de estimulación con LPS y la menor cantidad necesaria. Determinamos también que el efecto de los MC no está relacionado con cantidades traza de endotoxina que pudieran quedar en él, ya sea solubles o adheridos a la superficie extracelular.

Los medios condicionados de la línea celular U937 diferenciada *in vitro* con PMA y activada con endotoxina, es un acercamiento para, en parte reproducir la compleja mezcla de factores secretados por macrófagos del que el endotelio vascular *in vivo* es blanco.

## **Podemos visualizar el contexto de factores co-secretados con TNF- $\alpha$**

Los MC representan el conjunto de factores que los macrófagos producen y secretan al espacio extracelular en respuesta a la activación por endotoxina. Le llamamos contexto a todo aquello que es co-secretado junto con el TNF- $\alpha$ . Sin embargo, el TNF- $\alpha$  constituye en todo momento el punto de comparación que nos permite delimitar la activación endotelial, tal como ha sido reportada *in vitro* durante los últimos 30 años.

Por supuesto, el contexto no está constituido solamente de citocinas, ni siquiera únicamente de elementos protéicos. La riqueza de componentes presentes en estos medios ha sido ampliamente reportada (116, 196). En este sentido, el análisis que realizamos mediante geles denaturalizantes teñidos con plata, resulta de algún modo ilustrativo. La región correspondida entre 15 y 25 kD suponemos que está compuesta, en su mayoría, por monómeros polipéptidos, que en condiciones nativas constituirían la mayoría de las citocinas inflamatorias secretadas, es decir, la mayor parte de las citocinas están compuestas por polipéptidos dentro de este rango de tamaños. En esta zona del gel, es de hecho donde se observa un cambio en la intensidad al aumentar la concentración de endotoxina (Figura 11). El peso molecular del monómero de TNF- $\alpha$  es de aproximadamente 17 kDa y el del monómero de IL-1 $\beta$  es de 23 kDa, la diferencia en la intensidad de esta región en los geles, correlaciona con la actividad biológica y con la masa medida por ELISA de estas citocinas

Si bien los geles denaturalizantes no constituyen en lo absoluto un método de análisis profundo de la composición de los MC, permiten visualizar el amplio rango de elementos que constituyen lo que hemos llamado contexto. La variedad de todos los elementos presentes en estos medios condicionados, sugiere la existencia de una compleja red de interacciones.

Los macrófagos son células diferenciadas no-ciclantes que se encuentran arrestadas en el punto de control "*checkpoint*" de G1 y que derivan de monocitos de sangre periférica ciclantes (82). Las células de líneas promonocíticas humanas pueden ser llevadas a la diferenciación a macrófagos mediante estímulos bien

... proceso de muerte para  
3. ... activación constitutiva

Una vez activadas con LPS, las células U937 entran de lleno en un  
muerte de manera que puede observarse un deterioro morfológico  
A ese tiempo, puede observarse algo interesante, el TNF- $\alpha$  secretado

etectable por ELISA en cantidades importantes, sin embargo. Después  
ividad biológica (Figura 11). Está documentado que después  
crófagos comienzan a producir factores que van encaminados ya  
a respuesta inflamatoria (40, 199). La homeostasis de la respuesta

finamente regulada por una segunda respuesta, está de natura  
matoria que también ocurre rápida y localizadamente, pero de  
era. La inflamación es entonces un fenómeno reversible y autoreg

De manera que después de las 6 h, las mismas células U93  
res inhibitorios de la actividad biológica del TNF- $\alpha$ : TGF- $\beta$ , IL-  
nacrófagos presentan un estado agudo proinflamatorio alred  
ras 2 h, tiempo en el que se ha reportado el pico de TNF- $\alpha$  que  
ente sanguíneo tras la administración de endotoxina. (6)

específicamente entre 90 y 180 min, donde se alcanzan la  
ntes de alrededor de 0.3 ng/ml (Figura 12). A las 48  
dotoxina, las U937 no producen ya TNF- $\alpha$  biol  
ble por ELISA.

a cinética de secreción tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$   
a activación arranca desde la primera hora

endotoxina, y como después del primer pico de secreción, ésta comienza a decaer hacia las 6 h.

La razón por la que colectamos los Medios Condicionados a 3 h post-activación no sólo tiene que ver con la cinética de producción de citocinas inflamatorias, sino también con la naturaleza transitoria y aguda de la respuesta inflamatoria. La producción aguda de factores proinflamatorios ocurre en las primeras 3 h tras la estimulación con endotoxina (70, 110), la respuesta transcripcional en el endotelio puede comenzar a medirse desde los primeros 30 min (68).

### **La activación endotelial mediada por citocinas inflamatorias ocurre por vías bien documentadas**

Comenzamos por caracterizar la respuesta a citocinas inflamatorias recombinantes en nuestro sistema para poder compararlo con los MC. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son probablemente los estímulos mejor estudiados en activación endotelial. Se ha mapeado con detalle la vía de transducción que siguen tras la unión a sus receptores específicos localizados en membrana plasmática (159, 106)

La traslocación de NF- $\kappa$ B que encontramos en células HUVECs estimuladas con estas citocinas, es congruente con lo reportado en la literatura (170). Ocurre una traslocación aguda de NF- $\kappa$ B, expresión de moléculas de adhesión y un aumento en la capacidad de adhesión. Esta activación nos permite tener un punto de comparación en todo momento para evaluar la activación dependiente de MC.

Como todas las citocinas, tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  son factores solubles que se unen a receptores membranales de alta afinidad y que activan mediante cascadas de transcripción, el encendido de genes específicos (201). La cinasa NIK, de la familia de las MAP cinasas, se consideró durante mucho tiempo el elemento convergente de las señales provenientes del receptor de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  (202). Ahora la atención recae sobre el complejo formado por TIRAP y MyD88 (203) y sobre la cinasa TAK1(204).

Se llama disco de activación al complejo que forman los receptores de ambas citocinas y las proteínas adaptadoras. Este complejo tiene muchas



características comunes para, sin embargo, la afinidad de los receptores es distintas: 0.1 nM para TNF- $\alpha$  y 100 nM para IL-1 $\beta$ . Esta diferencia resulta interesante si se considera que las células blanco se enfrentan muchas veces con ambas citocinas al mismo tiempo. Es posible entonces que bajo estimulación simultánea, se recluten prioritariamente los elementos comunes que corresponden a la vía activada por TNF- $\alpha$ . Y probablemente, esta sea la razón por la que bajo el estímulo simultáneo de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  el fenotipo que observamos es equivalente al que ocurre bajo condiciones de estimulación con TNF- $\alpha$  solamente.

Durante mucho tiempo se consideró que las actividades de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  se traslapan sobre la célula endotelial y en cierto sentido, así es (205). Pero ¿ambas señales son necesarias, ó en la célula endotelial, podrían asegurar, una la función de la otra? Existen algunos ejemplos de genes que no se transcriben indistintamente bajo uno u otro estímulo. Uno de ellos es el que codifica para la molécula de superficie HLA-A, que solamente se expresa bajo inducción con TNF- $\alpha$ . Por otro lado, la vía iniciada en el receptor de TNF- $\alpha$  está conectada también hacia la activación de JNK y de AKt. Probablemente la muerte celular dependiente de TNF- $\alpha$  que se puede observar en HUVECs en las que se ha inhibido la síntesis de proteínas puede activar incluso otras rutas. Si bien nosotros en este trabajo solamente medimos como criterios de activación endotelial el aumento en la capacidad de adhesión, la presencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo y la desaparición de I $\kappa$ B en la fracción citoplásmica, los fenómenos desencadenados por el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  recombinantes son realmente mucho más complejos de lo que nos permite nuestro acercamiento experimental.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es punto de coincidencia de la vía activada por ambas citocinas pero, además, es la señal donde convergen la mayoría de los estímulos inflamatorios que son producidos por los macrófagos. Esto permite pensar que en realidad los elementos de la familia de NF- $\kappa$ B se arreglan de manera diferencial para obtener patrones distintos en la expresión genética cuando se trata de un estímulo o de otro.



## **El patrón de complejos de NF- $\kappa$ B traslocado por TNF- $\alpha$ y por IL-1 $\beta$ , no es el mismo**

Un hallazgo interesante fue el hecho de que la estimulación con TNF- $\alpha$  en células HUVECs indujera la formación de tres complejos de DNA-proteína visualizables en los ensayos de retardo y de sólo dos complejos en las células estimuladas con IL-1 $\beta$ . La utilización de anticuerpos en análisis tipos *supershift*, sugirió que la composición de los complejos I y III era equivalente. Con el propósito de resolver mejor estos complejos y de tener resultados más reproducibles, los ensayos de retardo se hicieron con geles al 7.5 % en los que esta diferencia podía apreciarse mejor. Resulta importante mencionar que no existe un reporte previo de esta diferencia, pese a lo bien estudiada que esta la traslocación de NF- $\kappa$ B en HUVECs estimuladas con estas dos citocinas. Una razón probable de ello es la concentración de los geles de retardo que utilizamos para este propósito

No pudimos establecer si esta diferencia pudiese tener alguna relevancia fisiológica. No hay que olvidar que los ensayos de retardo presentados aquí fueron realizados con uno oligonucleótido que contiene la secuencia decamérica consenso del sitio  $\kappa$ B. Esta secuencia no se encuentra en realidad en el promotor de ningún gene endógeno. La pregunta en este sentido es evidente: ¿algún promotor endógeno es capaz de reconocer esta diferencia a la que es sensible el sitio consenso?

Tratando de responder esta pregunta, diseñamos oligonucleótidos con los sitios  $\kappa$ B del promotor de Selectina-E, un gene relevante en nuestro sistema (35), con los que tratamos de repetir la observación, desafortunadamente ninguna de las secuencias construidas resulto inducible por TNF- $\alpha$  recombinante. Descartamos también la posibilidad de que el complejo II fuera producto de degradación realizando el ensayo en condiciones no reductoras (en ausencia de PMSF y DTT)

Aún así, el hecho de no compartir todas la subunidades que se traslocan al núcleo, abre la puerta a la posibilidad de que no sean equivalentes fenotípicamente la activación dependiente de IL-1 $\beta$  de la que ocurre en respuesta

a TNF- $\alpha$ . Equivalentes, no en el sentido de que ambos pueden inducir otras vías, sino con respecto a la traslocación de NF- $\kappa$ B

### **¿Qué quiere decir que las citocinas recombinantes saturan la adhesión y la traslocación de NF- $\kappa$ B?**

Quisimos dejar en claro experimentalmente que la estimulación con citocinas recombinantes induce un efecto saturable sobre las respuestas celulares que medimos en las HUVECs como síntoma de activación endotelial. Es decir, que existe una concentración para ambas citocinas por encima de la cual ya no se obtiene mayor traslocación ni mayor adhesión. Esta saturación ocurre a una dosis de 1ng/ml, e incluso cuando se estimulan a las HUVECs simultáneamente con ambas citocinas, a concentraciones mayores que ésta, no se aumentan los niveles significativamente.

Utilizamos 10 ng/ml e incluso 50 y 100 ng/ml de citocinas y una vez que determinamos este umbral, prácticamente todos los experimentos fueron realizados con esta concentración. Aunque 1ng/ml es la dosis saturante, existen reportes en la literatura que utilizan concentraciones de hasta 100 ng/ml de TNF- $\alpha$  para estimular células HUVECs (206). Cabe mencionar que estas concentraciones (tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$ ) están muy por encima de las Kd's de los receptores e incluso de la concentración que puede medirse en sangre tras un inóculo con LPS.

El hecho de que se observe saturación de la traslocación de NF- $\kappa$ B, nos llevó a preguntarnos si existía en el citoplasma una población del factor que ya no era sensible al efecto de las citocinas recombinantes pero que podía ser reclutada bajo otros estímulos (MC por ejemplo). Es decir, cuando se observa que una respuesta se satura ¿es que no hay más elementos del sistema disponibles? En este sentido llevamos a cabo experimentos de microscopía confocal en los que utilizamos como anticuerpo primario el dirigido contra la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Los resultados obtenidos mostraron que en el citoplasma de la célula endotelial, después de la estimulación con dosis saturantes de TNF- $\alpha$ , existe

todavía una población de NF- $\kappa$ B. Este dato fue confirmado con el *western blot* de la fracción citoplásmica. (Figura 15) La permanencia de esta población en el compartimiento citoplásmico nos llevó a plantear la posibilidad de una poza adicional de NF- $\kappa$ B que no puede ser reclutada por TNF- $\alpha$  ni por IL-1 $\beta$ .

### **El IFN- $\gamma$ reproduce la respuesta, pero no está presente en los MC**

Si bien el dato de amplificación obtenidos con la estimulación simultánea de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , resultó motivador en el sentido de que hay combinaciones de citocinas recombinantes que pueden mimetizar el efecto de los MC, no ofrece respuesta al mecanismo ejercido por éstos, simplemente porque IFN- $\gamma$  no es un componente de nuestros MC.

El IFN- $\gamma$  resultó ser una citocina capaz de reproducir el fenómeno de modulación positiva, es decir, es capaz de llevar la adhesión y la traslocación de NF- $\kappa$ B por encima de la saturación obtenida con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

El mecanismo por el cual el IFN- $\gamma$  potencia la actividad de TNF- $\alpha$  no se ha explorado con detalle. Está reportado para la expresión de la quimiocina IP-10 (207, 208) y para la expresión de ICAM-1, y parece involucrar la interacción directa entre miembros de la familia NF- $\kappa$ B (p65/p50 y p65/c-Rel) con el factor de transcripción que se activa en respuesta a IFN- $\gamma$ , Stat-1 $\alpha$  (209). Esta potenciación es específica para TNF- $\alpha$ , no ocurre con IL-1 $\beta$ , por ejemplo (210).

La exploración del mecanismo que ejerce el IFN- $\gamma$ , resultaba ajeno a este trabajo porque las células U937 no secretan IFN- $\gamma$  bajo el protocolo de diferenciación-activación (211). Lo que queda claro, sin embargo, es que existen citocinas que ejercen un efecto positivo sobre la actividad del TNF- $\alpha$  y cuya combinación con esta citocina permite pasar por encima de los niveles de saturación en activación endotelial.

Los factores inflamatorios que pudieran estar ejerciendo esta actividad y que son co-secretadas con TNF- $\alpha$ , son esencialmente: IL-6, IL-18, IL-8 y HMGB1 (100, 159). Queda pendiente la exploración de estas posibilidades, adicionándolas de manera simultánea con el TNF- $\alpha$  tratando de mimetizar el efecto de los MC.

## **Los Medios Condicionados inducen una activación cuantitativamente mayor y cualitativamente igual a la inducida por TNF- $\alpha$ recombinante**

A lo largo de la historia de la investigación básica ha quedado clara la enorme complejidad celular y sistémica que subyace a cada fenómeno bioquímico.

Si bien los MC son capaces de lograr una activación endotelial, medida como aumento en la capacidad de adhesión y translocación de NF- $\kappa$ B, mayor a la observada con TNF- $\alpha$ , los receptores y las vías de transducción involucradas permanecen inexplorados.

Lo que vemos fenotípicamente como activación endotelial nos permite decir, que los factores presentes en el MC convergen en la misma respuesta celular aumentando su magnitud. De los productos solubles que actúan como señales celulares, se sabe que en ocasiones distintos productos evocan la misma respuesta. Puede ser a través de distintos mecanismos, es decir, cada uno mediante sus propios sistemas de transducción.

## **La respuesta inducida por MC depende completamente de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

Los experimentos con anticuerpos neutralizantes demostraron que para bloquear el efecto inducido por MC es necesario neutralizar ambas citocinas, ya que bloquear el efecto de sólo una de ellas inhibe parcialmente la adhesión en células HUVECs. Sólo la inhibición simultánea resulta en un abatimiento completo de la respuesta. Esto quiere decir, que si bien ambas citocinas inflamatorias participan, hay un principio activo en el medio que potencia el efecto tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$  pero que por sí sólo no induce activación endotelial. Esto resulta importante si pensamos que durante la purificación de las citocinas recombinantes, los factores inflamatorios fueron purificados a partir de un solo pico de actividad. El principio activo que potencia el efecto de los MC no pudo haber sido purificado por su actividad pro-inflamatoria. Nuestros datos no contradicen los múltiples análisis de los productos de secreción de macrófagos activados por endotoxina, realizados por fraccionamiento, diálisis y diversas técnicas de purificación de proteínas (56).

Otros reportes de células HUVECs estimuladas con MC de macrófagos activados por endotoxina, señalan la importancia de TNF- $\alpha$  dentro del contexto del resto de las citocinas (212) y como su neutralización y/o inhibición puede bloquear la respuesta inducida por productos de secreción de macrófagos activados por endotoxina.

### **Los medios condicionados reclutan una poza adicional de NF- $\kappa$ B**

Si bien es cierto que la traslocación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  está muy bien documentada, el fenómeno de saturación observado por nosotros no ha sido explorado a fondo. Es decir, una vez que un estímulo determinado trasloca cantidades importantes de NF- $\kappa$ B al núcleo, ¿La célula puede responder nuevamente? ¿Después de cuanto tiempo? Sabemos, por ejemplo, que las HUVECs recuperan su capacidad de respuesta, tras 90 min del estímulo con TNF- $\alpha$  (datos no mostrados) sin embargo esto no significa que antes de este tiempo no responda a otro tipo de señal (independiente de TNF- $\alpha$ ) es decir, que exista todavía en la célula una cantidad importante de NF- $\kappa$ B que pueda ser reclutada por ejemplo en respuesta a la señal disparada por otros receptores.

### **¿La fuente de esta poza adicional de NF- $\kappa$ B son las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B- $\beta$ e I $\kappa$ B- $\epsilon$ ?**

El NF- $\kappa$ B que es posible detectar en el citoplasma tiene que estar secuestrado por algún mecanismo. Recordemos que el dominio Rel incluye señales de localización nuclear y que se encuentran ocultos por la interacción con las repeticiones de anquirina presentes en las proteínas I $\kappa$ B. En este sentido resultaba fundamental la medición de la desaparición de las tres isoformas de I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ) que han sido involucradas con la mayoría de las respuestas inducibles de NF- $\kappa$ B. Creemos entonces que la poza adicional de NF- $\kappa$ B seguramente está siendo secuestrada por una o varias isoformas de I $\kappa$ B, que no se degradan en respuesta al estímulo primario de TNF- $\alpha$ .



Congruentemente con lo reportado en la literatura, en respuesta a TNF- $\alpha$ , la isoforma I $\kappa$ B- $\alpha$  desaparece rápidamente y es también sintetizada *de novo* rápidamente (163), observando su reaparición al cabo de 60 min. Ocurre también una degradación secuencial de I $\kappa$ B- $\beta$  y de I $\kappa$ B- $\epsilon$ . Lo que hay que resaltar es que los MC inducen una degradación más rápida de las tres isoformas.

Como se ha mencionado, I $\kappa$ B- $\alpha$  es uno de los primeros genes que se transcriben en respuesta a la traslocación de NF- $\kappa$ B, y su síntesis *de novo* en el citoplasma está asociada a la inhibición de la respuesta. Se cierra así el circuito que permite una actividad transitoria del factor. Resulta interesante que en las HUVECs estimuladas con TNF- $\alpha$  observemos por *western blot*, una re-reaparición de I $\kappa$ B- $\alpha$  a los 60 min, cosa que no corre, tras la estimulación con MC. La isoforma I $\kappa$ B- $\beta$  fue de hecho caracterizada inicialmente como la responsable de causar una respuesta bifásica y sostenida de NF- $\kappa$ B (213). La cinética de degradación que ocurre en nuestro modelo es congruente también con lo reportado.

Se ha reportado que la isoforma I $\kappa$ B- $\epsilon$  está relacionada con los dímeros de NF- $\kappa$ B que contienen las subunidad c-Rel (174). El hecho de que la degradación de I $\kappa$ B- $\epsilon$  sea la más lenta de las tres, y que tras el estímulo con MC se acentúe este fenómeno, correlaciona con la cinética de expresión de las moléculas de adhesión que se observan en el endotelio. Como hemos mencionado, existen tres sitios de NF- $\kappa$ B en el promotor de selectina-E quien además aparece rápidamente en la superficie celular (el mensajero puede observarse desde los 30 min). La siguiente molécula en parecer es VCAM-1, quien presenta dos sitios  $\kappa$ B en el promotor de su gene. Se han llevado a cabo estudios *in vitro* que siguieren que la activación de estas dos moléculas de adhesión está muy relacionada, y que su expresión puede ser inhibida con fármacos similares (PDTC). En el promotor de ICAM-1, existe un solo sitio de unión para NF- $\kappa$ B y resulta interesante que el dímero que específicamente se una a este sitio sea el formado por p65/c-Rel (214). La expresión de esta ultima molécula de adhesión parece ser independiente a selectina-E y a VCAM-1 en el sentido de la inhibición por fármacos (215). La sobre expresión de c-Rel induce la activación específica de VCAM-1 por encima de



las otras dos moléculas de adhesión. Datos en nuestro laboratorio indican que el ácido acetil-salicílico no es capaz de bloquear la expresión de VCAM-1 mediada por IL-1 $\beta$  a diferencia de las otras dos moléculas de adhesión (26, 32). Estos trabajos le han adjudicado un papel particular a la isoforma  $\kappa$ B- $\epsilon$  durante la activación endotelial por su asociación específica con la subunidad c-Rel (174). En este sentido resulta interesante la cinética de degradación de  $\kappa$ B- $\epsilon$  inducida por los MC, que ocurre mas lentamente que la inducida por TNF- $\alpha$ . Se vuelve entonces muy importante comparar la expresión de VCAM-1, en respuesta a ambos estímulos. El dato de expresión de Selectina-E medida por citometría muestra un incremento significativo: (883 con TNF- $\alpha$  Vs 1189 con MC, en unidades de fluorescencia).

No hemos explorado los mecanismos alternativos que pudieran estar involucrados con el mantenimiento de NF- $\kappa$ B que se observa en el núcleo. Es decir, si el factor de transcripción induce la expresión de  $\kappa$ B, y en respuesta a los MC, la tasa de traslocación de NF- $\kappa$ B es mayor, entonces necesariamente existe una respuesta para inhibir la actividad de  $\kappa$ B cuando las células son estimuladas con MC ó un mecanismo que vuelve a las  $\kappa$ Bs menos susceptibles a la fosforilación por IKKs. Probablemente este mecanismo exista al nivel de la transcripción de  $\kappa$ B *de novo*, por que la re-aparición de la isoforma  $\alpha$ , no se observa al cabo de 60 min de estimulación con MC. En células de la glía por ejemplo, se ha reportado que la respuesta sostenida de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  esta relacionada con la lenta cinética de re-aparición de la isoforma  $\kappa$ B- $\beta$  (172)

### El TNF- $\alpha$ no es el único mediador de la respuesta inflamatoria

El incremento local de TNF- $\alpha$  produce los síntomas clásicos de inflamación: enrojecimiento, calor, dolor y aumento local de volumen. El incremento sistémico de TNF- $\alpha$  está asociado a daño tisular, reducción del índice cardíaco, trombosis microvascular y síndrome de debilidad capilar. El TNF- $\alpha$  además tiene la capacidad de amplificar y prolongar la respuesta inflamatoria mediada por otros factores como IL-1 $\beta$  y HMGB1 o de mediadores como ecosanoides, NO y ROS (216, 217).

En este trabajo se ha explorado la participación de TNF- $\alpha$  sobre la activación endotelial, no como molécula aislada, sino como parte de una compleja red de interacciones dentro de lo que llamamos contexto. Hemos concluido que, si bien tanto el TNF- $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  son fundamentales para inducir traslocación de NF- $\kappa$ B y aumento en la capacidad de adhesión, son co-secretadas con ellas uno o más principios activos, que son capaces de duplicar la actividad que estas citoquinas presentan.

Pese a que durante muchos años se consideró al TNF- $\alpha$  como el elemento clave de la inflamación, es cada vez más aceptado que la interacción de todos estos factores es de suma importancia para la completa expresión de la respuesta inflamatoria.

Así, aunque todo el mecanismo de inflamación (respuesta inmune innata, sepsis, falla multiorgánica) está tradicionalmente asociado a TNF- $\alpha$ , el contexto puede modular de manera importante la actividad de éste. Si bien el tratamiento del choque séptico, de la artritis reumatoide, de la enfermedad de Crohn y de otras enfermedades inflamatorias incluye la utilización de anticuerpos neutralizantes contra TNF- $\alpha$ , debiera tomarse en cuenta la participación de otros factores. La utilización de terapias, inhibidores, anticuerpos neutralizantes, inhibidores de síntesis enfocados a reducir la actividad de TNF- $\alpha$ , ha demostrado no tener resultados contundentes en la clínica.

### **Modelos *in vitro* Vs. modelos *in vivo***

Muchos de los fenómenos biológicos que son observados, por ejemplo en la clínica, no se comportan igual cuando se estudian en modelos *in vitro*. Por supuesto que los modelos *in vitro*, no pueden mimetizar completamente todas las variables involucradas en un fenómeno fisiológico, sin embargo, pueden proporcionar acercamientos útiles (74, 218). Farmacológicamente por ejemplo, las dosis a las que los factores recombinantes tienen efecto, es muy distinta *in vivo* que *in vitro*, donde en ocasiones son de un orden de magnitud mayores. No existe endotoxina en las bacterias gram-positivas, pero su pared celular contiene peptidoglicano y ácido lipoteitóico, pueden también activar receptores Toll-like (en

particular TRL2), sin embargo, los datos sobre su actividad inmune son inciertos ya que no existen evidencias clínicas que correlacionen las concentraciones en las que están presentes en sangre corresponda a aquellas que se han utilizado en todos los estudios *in vitro*. (90, 219)

Por otro lado, los modelos animales que se utilizan no reflejan ni la secuencia molecular que se observa *in vitro*, ni la secuencia clínica y celular que desarrollan los pacientes. Los blancos clínicos, es decir, las moléculas contra las que se dirigen los fármacos tienen que estar asociadas a fenómenos tardíos. De otra manera es difícil acertar el momento en el que resulta relevante intervenirlos. La sepsis se presenta en estadios tardíos de la infección y de la respuesta inflamatoria (220).

La alta complejidad y la intrincada regulación de la red de factores involucrados en el fenómeno inflamatorio, hace imposible predecir las consecuencias de bloquear o inhibir una sola de las vías participantes

### **Consecuencias *in vivo* de la amplificación del fenómeno inflamatorio.**

Es imposible sobrevivir sin vigilancia contra ataque y elementos extraños. La inmunidad innata continuamente protege al organismo de la presencia de invasiones y, cuando localiza un atacante monta, inmediatamente una respuesta inflamatoria discreta y localizada. La magnitud depende del estímulo antigénico que la dispara, una exacerbada activación celular puede resultar contraproducente para el organismo que se está tratando de resguardar. Los datos que hemos presentado sugieren que los procesos celulares inducidos por estímulos inflamatorios, pueden presentar fenómenos de sobre activación con respecto a las saturaciones que presentan *in vitro* con factores recombinantes.

Existen numerosas patologías en las que la sobre-expresión de la respuesta inflamatoria resulta en deterioro. Una de las mejor caracterizadas es el choque séptico. La patogénesis de la sepsis es sumamente compleja. Lo que resulta reconocible es la secuencia de eventos que clínicamente han sido caracterizados a detalle. La sepsis progresa en el organismo a lo largo de un continuo, a partir de un foco localizado de infección. Una infección crecida puede evolucionar a un

estado de sepsis, sepsis severa (sepsis con hipotensión) o convertirse en choque séptico (sepsis severa con hipotensión grave, perfusión sanguínea disminuida y eventos tromboticos) (221). La **falla multiorgánica** constituye en realidad la causa de muerte de los pacientes con choque séptico (181, 222). Es la respuesta inmune la causa de la muerte de los pacientes en choque y no la infección en si. Para su tratamiento se han intentado terapias neutralizantes contra el TNF- $\alpha$ , (anticuerpos, receptores solubles, inhibidores), inhibidores de endotoxina (polimixina B, péptidos antagonistas) todos ellos sin el éxito clínico esperado. En los últimos años se han utilizado fármacos inhibidores de la activación de NF- $\kappa$ B, también sin resultados contundentes (223, 224). La administración de antibióticos para controlar el foco infeccioso puede resultar contraproducente ya que en ocasiones promueve la lisis de microorganismos y por lo tanto un aumento en los niveles de endotoxina circulante (225). En general, administrado individualmente ningún fármaco tiene efectos determinantes, lo que habla de la complejidad que el fenómeno presenta *in vivo*. La secuencia de tratamientos recomendada clínicamente consiste en aplicar en el siguiente orden agentes antibióticos y estimuladores del sistema inmune, inhibidores de LPS, inhibidores de la coagulación, antioxidantes, antagonistas de citocinas y citocinas anti-inflamatorias (84). En ocasiones el efecto combinado de todos estos agentes puede aumentar las oportunidades de sobrevivencia. No existe entonces un blanco mágico, y de cualquier forma éste sólo tendría sentido si es posible monitorear todos los eventos y medirlos con un adecuado nivel de sensibilidad.

Ya que el endotelio vascular juega un papel primordial, sobre todo durante la primera etapa de los padecimientos inflamatorios, resulta propio tomar en cuenta estudios en los que la aproximación fisiológica se combine con un modelo *in vitro* que permita mediciones moleculares y bioquímicas. Si bien no podemos decir que la respuesta que observamos en este trabajo está en efecto exacerbada con respecto a la respuesta *in vivo*, si sabemos que existen condiciones donde puede medirse una mayor expresión de la descrita en la literatura. Aunque no sabemos su significado fisiológico, esto sugiere una gran complejidad en la interacción de los factores que participan y la necesidad de explorarla con más cuidado.

## REFERENCIAS

1. Hauser IA, Johnson DR, Madri JA. Differential induction of VCAM-1 on human iliac venous and arterial endothelial cells and its role in adhesion. *J Immunol* 1993;151(10):5172-85.
2. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987;18(3):234-9.
3. Karsan A, Harlan JM. Modulation of endothelial cell apoptosis: mechanisms and pathophysiological roles. *J Atheroscler Thromb* 1996;3(2):75-80.
4. Wang W, Passaniti A. Extracellular matrix inhibits apoptosis and enhances endothelial cell differentiation by a Nf-kappaB-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 1999;73(3):321-31.
5. Stern DM, Bank I, Nawroth PP, Cassimeris J, Kisiel W, Fenton JW, 2nd, et al. Self-regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface. *J Exp Med* 1985;162(4):1223-35.
6. Ayala A, Chaudry IH. Platelet activating factor and its role in trauma, shock, and sepsis. *New Horiz* 1996;4(2):265-75.
7. Nawroth PP, Stern DM. Endothelial cell procoagulant properties and the host response. *Semin Thromb Hemost* 1987;13(4):391-7.
8. Maruyama I. Biology of endothelium. *Lupus* 1998;7(Suppl 2):S41-3.
9. Sethi S, Eastman AY, Eaton JW. Inhibition of phagocyte-endothelium interactions by oxidized fatty acids: a natural anti-inflammatory mechanism? *J Lab Clin Med* 1996;128(1):27-38.
10. Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost* 1997;78(1):406-14.
11. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 2000;6(7):591-603.
12. Bach PH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today* 1997;18(10):483-6.
13. Shafer RA, Murphy S. Activated astrocytes induce nitric oxide synthase-2 in cerebral endothelium via tumor necrosis factor alpha. *Glia* 1997;21(4):370-9.
14. Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl A):31-9.
15. Toborek M, Hennig B. Is endothelial cell autocrine production of tumor necrosis factor a mediator of lipid-induced endothelial dysfunction? *Med Hypotheses* 1996;47(5):377-82.
16. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999;20(6):254-7.
17. Galley HF, Nelson SJ, Dhillon J, Dubbels AM, Webster NR. Effect of the nitric oxide inhibitor, L-N(G)-monomethylarginine, on accumulation of interleukin-6 and interleukin-8, and nuclear factor- kappaB activity in a human endothelial cell line. *Crit Care Med* 1999;27(5):908-12.
18. Mantovani A. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol* 1999;72:1-6.
19. Cummings CJ, Martin TR, Prevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* 1999;162(4):2341-6.
20. Dejana E, Del Maschio A. Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb Haemost* 1995;74(1):309-12.
21. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 1995;9(10):910-8.
22. Moldovan L, Moldovan NI, Sohn RH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res* 2000;86(5):549-57.
23. Drouot L. Venous thromboembolic pathology. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2001;94(11 Suppl):1318-26.
24. Yan HC, Delisser HM, Pilewski JM, Barone KM, Szklut PJ, Chang XJ, et al. Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-selectin. *J Immunol* 1994;152(6):3053-63.
25. Jahnke A, Van de Stolpe A, Caldenhoven E, Johnson JP. Constitutive expression of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is regulated by differentially active enhancing and silencing elements. *Eur J Biochem* 1995;228(2):439-46.
26. Ronald JA, Ionescu CV, Rogers KA, Sandig M. Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J Leukoc Biol* 2001;70(4):601-9.



27. Winkler M, Kemp B, Fischer DC, Ruck P, Poth D, Rath W. Tissue concentrations of endothelial cell adhesion molecules in the lower uterine segment during term parturition. *Obstet Gynecol* 2000;95(3):363-6.
28. Parikh SA, Edelman ER. Endothelial cell delivery for cardiovascular therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42(1-2):139-61.
29. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, et al. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by NF-kappaB-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cells proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 2003;2.
30. Winkler M, Kemp B, Hauptmann S, Rath W. Parturition: steroids, prostaglandin E2, and expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Obstet Gynecol* 1997;89(3):398-402.
31. Fischer DC, Winkler M, Ruck P, Poth D, Kemp B, Rath W. Localization and quantification of adhesion molecule expression in the lower uterine segment during premature labor. *J Perinat Med* 2001;29(6):497-505.
32. Chen CC, Manning AM. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. *Agents Actions Suppl* 1995;47:135-41.
33. Ray KP, Farrow S, Daly M, Talbot P, Searle N. Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids. *Biochem J* 1997;322(Pt 2):707-15.
34. Whitley MZ, Thanos D, Read MA, Maniatis T, Collins T. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol* 1994;14(10):6464-75.
35. Schindler U, Baichwal VR. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 1994;14(9):5820-31.
36. Min W, Pober JS. TNF initiates E-selectin transcription in human endothelial cells through parallel TRAF-NF-kappa B and TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 pathways. *J Immunol* 1997;159(7):5508-18.
37. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997;272(5):2753-61.
38. Lewis H, Kaszubska W, DeLamarier JF, Whelan J. Cooperativity between two NF-kappa B complexes, mediated by high-mobility-group protein 1(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol Cell Biol* 1994;14(9):5701-9.
39. Tamaru M, Narumi S. E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1999;274(6):3753-63.
40. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996;157(1):360-8.
41. Sheppard AM, McQuillan JJ, Iademarco MF, Dean DC. Control of vascular cell adhesion molecule-1 gene promoter activity during neural differentiation. *J Biol Chem* 1995;270(8):3710-9.
42. Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1999;369(2):237-45.
43. Kemp B, Winkler M, Hauptmann S, Rath W. Cervical dilatation: induction by antigestagens via adhesion molecules. An in vitro examination in endothelial cell cultures. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45(2):116-20.
44. Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 1991;354(6350):233-5.
45. Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol* 1999;162(5):2990-6.
46. Kurokouchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H, et al. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *Journal of Bone and Mineral Research : the Official Journal of the American Society For Bone and Mineral Research* 1998;13(8):1290-9.
47. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an



antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92(4):1866-74.

48. Moynagh PN, Williams DC, O'Neill LA. Activation of NF-kappa B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. Modulation by antioxidants. *J Immunol* 1994;153(6):2681-90.

49. Lauzurica P, Martinez-Martinez S, Marazuela M, Gomez del Arco P, Martinez C, Sanchez-Madrid F, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-alpha. *Eur J Immunol* 1999;29(6):1890-900.

50. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefler AM. Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J Exp Med* 1999;189(6):931-8.

51. Pan J, Xia L, Yao L, McEver RP. Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/cAMP response element. *J Biol Chem* 1998;273(16):10068-77.

52. Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I, et al. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18(3):1266-74.

53. Xia L, Pan J, Yao L, McEver RP. A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood* 1998;91(5):1625-32.

54. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320(6063):584-8.

55. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232(4753):977-80.

56. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci* 1990;587:325-31.

57. Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* 1991;5(12):2652-60.

58. Jue DM, Sherry B, Luedke C, Manogue KR, Cerami A. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* 1990;29(36):8371-7.

59. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986;163(6):1433-50.

60. Beutler B, Cerami A. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* 1988;27(20):7575-82.

61. Wallach D. Cytotoxins (tumour necrosis factor, lymphotoxin and others): molecular and functional characteristics and interactions with interferons. *Interferon* 1986;7:89-124.

62. Zentella A, Manogue K, Cerami A. Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine* 1993;5(5):436-47.

63. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985;161(5):984-95.

64. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318(23):1481-6.

65. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330(6149):662-4.

66. Murphy K, Haudek SB, Thompson M, Giroir BP. Molecular biology of septic shock. *New Horiz* 1998;6(2):181-93.

67. Tracey KJ, Mergello S, Koplun B, Fahey TJ, 3rd, Fox J, Aledo A, et al. Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominantly acute anorexia. *J Clin Invest* 1990;86(6):2014-24.

68. Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2001;70(3):317-25.

69. Gupta S, Xia D, Jiang M, Lee S, Pernis AB. Signaling pathways mediated by the TNF- and cytokine-receptor families target a common cis-element of the IFN regulatory factor 1 promoter. *J Immunol* 1998;161(11):5997-6004.
70. Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62(1 Pt 2):S3-10.
71. Oberg F, Botling J, Nilsson K. Macrophages and the cytokine network. *Transplant Proc* 1993;25(2):2044-7.
72. Ayala A, Perrin MM, Kisala JM, Ertel W, Chaudry IH. Polymicrobial sepsis selectively activates peritoneal but not alveolar macrophages to release inflammatory mediators (interleukins-1 and -6 and tumor necrosis factor). *Circ Shock* 1992;36(3):191-9.
73. Naito M, Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umezumi H, Hasegawa G, et al. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* 1996;59(2):133-8.
74. Bocchat N, Bouchonnet F, Bonay M, Crodet A, Pelicic V, Cicquel B, et al. Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *J Immunol* 2001;166(10):6203-11.
75. Cannistra SA, Spriggs DK, Herrmann F, Kufe D, Griffin JD. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes. *J Clin Invest* 1987;79(6):1720-8.
76. Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 1998;16(5):301-13.
77. Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biondo C, von Hunolstein C, Orefici G, et al. Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products. *Infect Immun* 2000;68(2):994-8.
78. Liu H, Perlman H, Pagliari LJ, Pope RM. Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J Exp Med* 2001;194(2):113-26.
79. Pennington KN, Taylor JA, Bren GD, Paya CV. IkappaB kinase-dependent chronic activation of NF-kappaB is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol Cell Biol* 2001;21(6):1930-41.
80. Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 activates macrophage differentiation in M1 myeloblastic leukemia cells. *Blood* 1998;92(6):1957-66.
81. Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (Fc gamma RIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology* 2001;102(3):331-7.
82. Olikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Conti B, Hoffmann MK. Two distinct pathways of human macrophage differentiation are mediated by interferon-gamma and interleukin-10. *Immunology* 1997;91(1):104-8.
83. Kaisho T, Akira S. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 2000;20(5):393-405.
84. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med* 2003;138(6):502-5.
85. Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT. Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 1999;162(12):6971-5.
86. Golenbock DT, Fenton MJ. Extolling the diversity of bacterial endotoxins. *Nat Immunol* 2001;2(4):286-8.
87. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274(16):10689-92.
88. Akira S. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem Soc Trans* 2000;28(5):551-6.
89. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemeermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998;188(2):305-15.
90. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998;64(1):25-32.
91. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2(9):835-41.

92. Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res* 2000;6(5):383-7.
93. Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(22):12654-8.
94. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000;165(7):3541-4.
95. Aderem A. How to eat something bigger than your head. *Cell* 2002;110(1):5-8.
96. Nathan CF, Tsunawaki S. Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase. *Ciba Found Symp* 1986;118:211-30.
97. Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80(6):1550-60.
98. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79(2):319-26.
99. Lachman LB, Page SO, Metzgar RS. Purification of human interleukin 1. *J Supramol Struct* 1980;13(4):457-66.
100. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991;113(5):981-6.
101. Lavon I, Goldberg I, Amit S, Landsman L, Jung S, Tsuberi BZ, et al. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med* 2000;6(5):573-7.
102. Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, Bronson R, Beg AA, Scott M, et al. Targeted mutation of TNF receptor 1 rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol* 2001;167(3):1592-600.
103. Caille V BP, Grimaldi D, Vieillard-Baro A. Physiopathology of severe sepsis. *Presse Med* 2004;33(4):256-61.
104. Blatteis CM. The afferent signalling of fever. *J Physiol* 2000;526 Pt 3:470.
105. Perlito M, Romanenko OG, Ashton S, Squadrito F, Halushka PV, Cook JA. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J Leukoc Biol* 2001;70(5):821-9.
106. Dokter WH, Dijkstra AJ, Koopmans SB, Stulp BK, Keck W, Halie MR, et al. G(Anh)MTebra, a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 1994;269(6):4201-6.
107. Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* 1994;56(5):542-7.
108. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994;269(18):13289-95.
109. Parikh AA, Moon MR, Pritts TA, Fischer JE, Szabo C, Hasselgren PO, et al. IL-1beta induction of NF-kappaB activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling. *Shock* 2000;13(1):8-13.
110. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117(4):1162-72.
111. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Ferguson DA, Jr. Early activation of hepatic NFkappaB and NF-IL6 in polymicrobial sepsis correlates with bacteremia, cytokine expression, and mortality. *Ann Surg* 1999;230(1):95-104.
112. Miyazawa K, Mori A, Miyata H, Akahane M, Ajisawa Y, Okudaira H. Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273(38):24832-8.
113. Navarro S, Debili N, Bernaudin JF, Vainchenker W, Doly J. Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 1989;142(12):4339-45.
114. Taimi M, Defacque H, Commes T, Favero J, Caron E, Marti J, et al. Effect of retinoic acid and vitamin D on the expression of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the human monocytic cell line U937. *Immunology* 1993;79(2):229-35.
115. Merola M, Blanchard B, Tovey MG. The kappa B enhancer of the human interleukin-6 promoter is necessary and sufficient to confer an IL-1 beta and TNF-alpha response in transfected human cell lines: requirement for members of the C/EBP family for activity. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16(10):783-98.
116. Cairns JA, Guy GR, Tan YH. Interleukin-6 regulates the cytotoxic effect of tumour necrosis factor on U937 cells. *Immunology* 1992;75(4):669-73.



117. Gracve L, Baumann M, Heinrich PC. Interleukin-6 in autoimmune disease. Role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense. *Clin Investig* 1993;71(8):664-71.
118. Geisterfer M, Richards C, Baumann M, Fey G, Gywnne D, Gauldie J. Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation in vivo. *Cytokine* 1993;5(1):1-7.
119. Ayala A, Perrin MM, Wang P, Chaudry IH. Sepsis induces an early increased spontaneous release of hepatocellular stimulatory factor (interleukin-6) by Kupffer cells in both endotoxin tolerant and intolerant mice. *J Surg Res* 1992;52(6):635-41.
120. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47(6):921-8.
121. Baldwin AS, Jr., Sharp PA. Two transcription factors, NF-kappa B and H2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(3):723-7.
122. Cross SL, Halden NF, Lenardo MJ, Leonard WJ. Functionally distinct NF-kappa B binding sites in the immunoglobulin kappa and IL-2 receptor alpha chain genes. *Science* 1989;244(4903):466-9.
123. Gilmore TD. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* 1990;62(5):841-3.
124. Ghosh S, Clifford AM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP, Baltimore D. Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* 1990;62(5):1019-29.
125. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990;344(6267):678-82.
126. Mercurio F, DiDonato J, Rosette C, Karin M. Molecular cloning and characterization of a novel Rel/NF-kappa B family member displaying structural and functional homology to NF-kappa B p50/p105. *DNA Cell Biol* 1992;11(7):523-37.
127. Beg AA, Baldwin AS, Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993;7(11):2064-70.
128. Li CC, Dai RM, Chen E, Longo DL. Phosphorylation of NF-kappa B-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem* 1994;269(48):30089-92.
129. Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(6):2532-6.
130. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1993;365(6442):182-5.
131. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1997;388(6642):548-54.
132. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I kappa B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I kappa B phosphorylation and NF-kappa B activation. *Cell* 1997;91(2):243-52.
133. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, et al. Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996;16(4):1295-304.
134. Roff M, Thompson J, Rodriguez MS, Jacque JM, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, et al. Role of I kappa B-alpha ubiquitination in signal-induced activation of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem* 1996;271(13):7844-50.
135. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
136. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. I kappa B kinase-beta: NF-kappa B activation and complex formation with I kappa B kinase-alpha and NIK. *Science* 1997;278(5339):866-9.
137. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20(44):6482-91.
138. Hochman PS, Majeau GR, Mackay P, Browning JL. Proinflammatory responses are efficiently induced by homotrimeric but not heterotrimeric lymphotoxin ligands. *J Inflamm* 1995;46(4):220-34.
139. Borset M, Medvedev AE, Sundan A, Espevik T. The role of the two TNF receptors in proliferation, NF-kappa B activation and discrimination between TNF and LT alpha signalling in the human myeloma cell line OH-2. *Cytokine* 1996;8(6):430-8.
140. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84(2):299-308.

141. Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6721-5.
142. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 1997;7(6):831-6.
143. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383(6599):443-6.
144. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7(6):837-47.
145. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V. Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor-kappaB induction by IL-1beta in epithelial and lymphoid cells. *J Immunol* 1997;159(11):5264-72.
146. Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):414-29.
147. Shimizu H, Yamamoto K. NF-kappa B and C/EBP transcription factor families synergistically function in mouse serum amyloid A gene expression induced by inflammatory cytokines. *Gene* 1994;149(2):305-10.
148. Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, et al. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2001;2(7):620-4.
149. Huang TT, Miyamoto S. Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I kappa Balpha. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21(14):4737-47.
150. Pullen SS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* 1999;274(20):14246-54.
151. Guerrini L, Molteni A, Blasi F. Possible stage-specific function of NF-kappaB during pre-B cell differentiation. *FEBS Lett* 1998;434(1-2):140-4.
152. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):725-34.
153. Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 2002;277(2):1405-18.
154. Liu ZQ, Kunimatsu M, Yang JP, Ozaki Y, Sasaki M, Okamoto T. Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro. *FEBS Lett* 1996;385(1-2):109-13.
155. Shumway SD, Maki M, Miyamoto S. The PEST domain of I kappa Balpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J Biol Chem* 1999;274(43):30874-81.
156. Iwahashi H, Takeshita A, Hanazawa S. Prostaglandin E2 stimulates AP-1-mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP-dependent protein kinase A. *J Immunol* 2000;164(10):5403-8.
157. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselberg S. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 1997;198(1-3):35-49.
158. Meldrum DR, Meng X, Sheridan BC, McIntyre RC, Jr., Harken AH, Banerjee A. Tissue-specific protein kinase C isoforms differentially mediate macrophage TNFalpha and IL-1beta production. *Shock* 1998;9(4):256-60.
159. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372-7.
160. Khoshnan A, Bae D, Tindell CA, Nel AE. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 2000;165(12):6933-40.
161. Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the I kappa Balpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 1998;95(6):759-70.
162. Baeuerle PA. I kappa B-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 1998;95(6):729-31.
163. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annual Review of Immunology* 2000;18:621-63.
164. Latimer M, Ernst MK, Dunn LL, Drutskaya M, Rice NR. The N-terminal domain of I kappa Balpha masks the nuclear localization signal(s) of p50 and c-Rel homodimers. *Mol Cell Biol* 1998;18(5):2640-9.

165. Bourke E, Kennedy EJ, Moynagh PN. Loss of Ikappa B-beta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells. *J Biol Chem* 2000;275(51):39996-40002.
166. Renard P, Percherancier Y, Kroll M, Thomas D, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear IkappaBalpha. *J Biol Chem* 2000;275(20):15193-9.
167. Chen CG, Malliaros J, Katerelos M, d'Apice AJ, Pearce MJ. Inhibition of NF-kappaB activation by a dominant-negative mutant of IkappaBalpha. *Mol Immunol* 1996;33(1):57-61.
168. Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R. Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med* 1998;188(6):1055-62.
169. Johnson DR, Douglas I, Jahnske A, Ghosh S, Pober JS. A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271(27):16317-22.
170. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 1995;80(4):573-82.
171. Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J Biol Chem* 1999;274(45):32091-8.
172. Simeonidis S, Liang S, Chen G, Thanos D. Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14372-7.
173. Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D. Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(1):49-54.
174. Spiecker M, Darius H, Liao JK. A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol* 2000;164(6):3316-22.
175. Peef GW, Li J. IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 1999;274(46):32655-61.
176. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998;101(5):1163-74.
177. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107(2):135-42.
178. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-11.
179. Hughes K, Antonsson A, Grundstrom T. Calmodulin dependence of NFkappaB activation. *FEBS Lett* 1998;441(1):132-6.
180. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001;107(1):3-6.
181. Chaudry IH. Sepsis: lessons learned in the last century and future directions. *Arch Surg* 1999;134(9):922-9.
182. Jaffe EA, Nachmen RL, Becker GC, Minick CR. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J. Clin. Invest* 1973;52:2745-2756.
183. Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996;156(9):3435-42.
184. Kramer SM, Carver ME. Serum-free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 1986;93:201-206.
185. Kim J FR. Activated Fes protein tyrosine kinase induces terminal macrophage differentiation of myeloid progenitors (U937 cells) and activation of the transcription factor PU.1. *Mol Cell Biol* 2002;22(6):1903-18.
186. Defacque H, Commes T, Contet V, Sevilla C, Marti J. Differentiation of U937 myelomonocytic cell line by all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3: synergistic effects on tissue transglutaminase. *Leukemia* 1995;9(10):1762-7.
187. Pucillo CE, Colombatti A, Vitale M, Salzano S, Rossi G, Formisano S. Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology* 1993;80(2):248-52.
188. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274(25):17406-9.
189. Herrmann JL, Beham AW, Sarkiss M, Chiao PJ, Rands MT, Bruckheimer EM, et al. Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kappa B survival pathway. *Exp Cell Res* 1997;237(1):101-9.



190. Andrew PW, Rees AD, Scoging A, Dobson N, Matthews R, Whittall JT, et al. Secretion of a macrophage-activating factor distinct from interferon- gamma by human T cell clones. *Eur J Immunol* 1984;14(10):962-4.
191. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(10):3460-4.
192. Israel S, Hahn T, Holtmann H, Wallach D. Binding of human TNF-alpha to high-affinity cell surface receptors: effect of IFN. *Immunol Lett* 1986;12(4):217-24.
193. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood* 1998;92(10):3924-35.
194. Aderem A, Hood L. Immunology in the post-genomic era. *Nat Immunol* 2001;2(5):373-5.
195. van den Berg CW, Williams OM, Morgan BP. Presence of a dysfunctional form of CD59 on a CD59<sup>+</sup> subclone of the U937 cell line. *Immunology* 1994;81(4):637-42.
196. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420(6917):846-52.
197. Freytag SO. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol Cell Biol* 1988;8(4):1614-24.
198. Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. Pneumocystis carinii cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kB activation. *J Biol Chem* 2003;278:2525.
199. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995;270(20):11703-6.
200. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420(6917):853-9.
201. Baumann H, Morella KK, Wong GH. TNF-alpha, IL-1 beta, and hepatocyte growth factor cooperate in stimulating specific acute phase plasma protein genes in rat hepatoma cells. *J Immunol* 1993;151(8):4248-57.
202. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997;90(2):373-83.
203. Dixit V, Mak TW. NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell* 2002;111(5):615-9.
204. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-1 kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999;398(6724):252-6.
205. Wyble CW, Hynes KL, Kuchibhotla J, Marcus BC, Hallahan D, Gewertz BL. TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway. *J Surg Res* 1997;73(2):107-12.
206. Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, et al. NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1 beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol* 2000;67(4):577-84.
207. Majumder S, Zhou LZ, Chaturvedi P, Babcock G, Aras S, Ransohoff RM. p48/STAT-1 alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *J Immunol* 1998;161(9):4736-44.
208. Ohmori Y, Hamilton TA. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1995;154(10):5235-44.
209. Jahnke A, Johnson JP. Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF-alpha and IFN-gamma is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN-gamma and IFN-alpha. *FEBS Lett* 1994;354(2):220-6.
210. Doukas J, Pober JS. IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol* 1990;145(6):1727-33.
211. Tabuchi Y, Kondo T, Ogawa R, Mori H. DNA microarray analyses of genes elicited by ultrasound in human U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(1):498-503.
212. Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in FCV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(6):978-91.
213. Hirano F, Chung M, Tanaka H, Maruyama N, Makino I, Moore DD, et al. Alternative splicing variants of IkappaB beta establish differential NF-kappaB signal responsiveness in human cells. *Mol Cell Biol* 1998;18(5):2596-607.
214. Aoudjit F, Brochu N, Belanger B, Stratowa C, Hiscott J, Audette M. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene by tumor necrosis factor-alpha is mediated by the nuclear

- factor-kappaB heterodimers p65/p65 and p65/c-Rel in the absence of p50. *Cell Growth Differ* 1997;8(3):335-42.
215. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998;102(9):1645-52.
216. Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* 2000;191(12):2131-44.
217. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296(5566):298-300.
218. Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 2001;14(3):162-9.
219. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
220. Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996;24(6):1072-8.
221. Opal SM, Cross AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13(2):285-97, vii.
222. Levy MM, FM, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530-8.
223. Dhannaut JF, YS, Claessens YE. Protein C/activated protein C pathway: overview of clinical trial results in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2004;32(5 Suppl):S194-201.
224. Chehab MS. Can we reduce mortality in sepsis? *Saudi Med J*. 2004;25(3):277-84.
225. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348(2):138-50.

## APENDICES

## Tabla 1

### Productos secretados por fagocitos mononucleares

#### Citocinas y hormonas polipeptídicas

Interleucina 1  $\beta$  y  $\alpha$   
Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$   
Interferon- $\alpha$   
Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
Factor de crecimiento de Fibroblastos  
Factor activador de Fibroblastos  
Factor transformante- $\beta$   
Timosina  
Eritropoietina  
Factor estimulante de granulocitos y macrófagos  
Factor estimulante de colonias de granulocitos  
Factor potenciador de colonias eritroides  
Factor inductor de monocitopoyesis  
 $\beta$ -endorfina  
hormona adenohipofisaria

#### Inhibidores enzimáticos y de citocinas

Inhibidores de proteasas:  
 $\alpha$ 2-macroglobulina, A-1-antiproteasa, inhibidores de collagenasas, inhibidores de plasmina  
Inhibidores de fosfolipasas:  
lipomodulina, inhibidores de IL-1

#### Proteínas de matriz extracelular y de adhesión

Fibronectina  
Proteína unidora de gelatina de 95 kD  
Trombospondina  
Proteoglicano de condroitin sulfato

Factor de crecimiento de plasmocitoma  
Factor activador de neutrófilos

#### Componentes del complemento

De la vía clásica: C1, C3, C5, C4  
De la vía no-clásica: factor B, factor D, properdina  
Inhibidores: inactivador de C3 $\beta$ ,  $\beta$ -1H  
Fragmentos activos generados por proteasas secretadas por macrófagos

#### Factores de coagulación

Vía intrínseca: IX, X, V, protrombina  
Vía extrínseca: VII

#### Actividades de superficie:

Factor tisular, protrombinasa

#### Otras proteínas de unión

Para metales: transferrina, isoferritinas ácidas, transcobalamina II  
Para lípidos: apolipoproteína E, proteína transferidora de lípidos  
Para biotina: Avidina

#### Oligopeptidos bioactivos

Glutation

#### Lípidos Bioactivos

Productos de la ciclooxigenasa:  
prostaglandina E2, prostaglandina F2a, prostaciclina, tromboxano  
Productos de lipoxigenasas:  
ácido monohidroxiicosatetraenoico, leucotrienos B4, C, D, E

Actividad protrombolítica:  
activador de plasminógeno  
Actividad antitrombolítica:  
Inhibidor del activador de plasminógeno, inhibidores de plasmina

#### Otras enzimas

Proteasas neutrales:  
Activador de plasminógeno, elastasa, collagenasas, convertasa de angiotensinógeno  
Lipasas: lipoproteína lipasa, fosfolipasa A2  
Glucosaminidasas: lisosima  
Hidrolasas lisosomales ácidas:  
Proteasas, lipasas, DNA y RNAsas, fosfatasa, glicosidasa, sulfatasa  
Desaminasas: arginasas

#### Hormonas esteroides

Dihidroxivitamina D3

#### Productos de purina y pirimidina:

Timidina, uracilo, ácido úrico, deoxicitidina, neopterina,

#### Intermediarios reactivos de oxígeno

Superoxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo

#### Intermediarios reactivos de nitrógeno:

Nitritos, nitratos

## Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock

### Running Title: Molecular mechanisms of septic shock

Lucia Nikolaia López-Bojórquez<sup>§</sup>, Alejandro Zentella Dehesa<sup>§</sup>, Gustavo Reyes-Terán\*<sup>¶</sup>

<sup>§</sup> Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 40-198 Circuito Exterior,, Ciudad Universitaria. 32170 México D.F.,

[llopez@ifc.unam.mx](mailto:llopez@ifc.unam.mx),

[azentell@ifc.unam.mx](mailto:azentell@ifc.unam.mx)

\* Departamento de Infectología. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan Tlalpan 4502, 14080 México D.F  
[greves@sin.conacyt.mx](mailto:greves@sin.conacyt.mx)

### Abstract

Pathogenesis of the development of sepsis is highly complex and has been the object of study for many years. The inflammatory phenomena underlying septic shock are described in this review, as well as the enzymes and genes involved in the cellular activation that precedes this condition. The most important molecular aspects are discussed, ranging from the cytokines involved and their respective transduction pathways to the cellular mechanisms related to accelerated catabolism and multi-organ failure.

### Key words

Septic shock, SIRS, inflammatory-cytokines, Toll receptors, NF- $\kappa$ B

### INTRODUCTION

In the last decade, biomedical research has contributed to a better understanding of the mechanisms of sepsis pathogenesis (*the how*), but has not clarified the reasons for these syndromes to occur (*the why*), nor the reasons that account for the diverse temporality of inflammatory phenomena and their clinical expressions. In this regard, possible explanations converge in a peculiar response of the host immune system. The understanding of how the immune system discriminates between self and non-self, thus inhibiting autoimmune responses while allowing the host to react against infective agents is a key issue in immunology (1). The purpose of this review is to assess some molecular aspects involved in the switching on and subsequent pathogenesis of septic shock.

### Septic shock and other notions

Sepsis connotes a clinical syndrome that may occur in any age group, in very different patient populations, and in response to a multitude of microbial pathogens present in multiple sites within the human body. A concerted effort has been made to standardize definitions of sepsis by gathering international committees and consensual opinions from panels of experts in sepsis research. While consensus definitions of sepsis have proven to be of value, alike continues to be problematic.

**Infection** is defined as a pathologic process caused by the invasion of normally sterile tissue or fluid or body cavity by pathogenic or potentially pathogenic microorganisms (2). Approximately 30 million annual deaths occur worldwide due to severe infections. Most are related to events associated with **systemic inflammatory response syndrome (SIRS)** that can lead to septic shock (3). SIRS can be triggered by a variety of infectious and non-infectious conditions. **Sepsis** results from the evolution of infection as a continuum from a single source in the organism. It is a clinical disorder defined by the presence of both infection and systemic inflammation (2). Deficiently treated infection may evolve into **bacteremia** (bacterial activity in the blood stream) and **septic syndrome** (defined as severe infection and SIRS), **severe sepsis** (sepsis with hypotension) and **septic shock** (severe sepsis with severe and irreversible hypotension, reduced perfusion and thrombosis events). Septic shock in adults refers to a state of acute circulatory failure characterized by persistent arterial hypotension unexplained by another cause (2)

Pathogenesis of sepsis is highly complex and has been the ground for research lines of groups worldwide. Signs of systemic can manifest in the absence of infection in patients with burns, pancreatitis and other disease states. Some other biochemical criteria should be considered to limit SIRS definition, like the presence of inflammation when circulating concentrations of IL-6, procalcitonin or C-reactive protein are increased (2)

About 40 % of patients with sepsis evolve to the shock condition. Approximately 150,000 people die annually in Europe and more than 200,000 die annually in the US from severe sepsis. In intensive care units the general mortality as a result of septic shock is 60 %, and it is higher when only patients older than 65 years are considered. Sepsis represents 10 % of total deaths registered in the world. In Latin America, documented child mortality due to sepsis is 17 % (3). Even though in Mexico the statistics are scarce, recent surveys show alarming numbers. A study performed in patients admitted in a general hospital showed 17.6% bacteremic episodes, in which the most prevalent agents were *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* and *Salmonella* (4). Other study detected episodes of bacteremia in 15.5% of newborn admissions. Overall



mortality was 34%, but sepsis-related mortality was 13%. The incidence of sepsis in intrahospitalary population was 11% in ICU, with a 47% mortality (5)

Recently a new conceptual framework for understanding sepsis has been developed, called the **PIRO** concept (predisposition, infection, response and organ dysfunction) PIRO stratifies patients on the basis of their predisposing conditions, the nature and magnitude of the host response, and the degree of concomitant organ dysfunction (2). **Multiple organ dysfunction syndrome** (MODS) consists of generalized metabolic failure. Associated to this generalized deterioration, an increase in the basal metabolic rate occurs, with and alterations in metabolic homeostasis that direct to a rapid decrement in the corporal mass.

### Sequence of events in sepsis

Sepsis initiates when a high dose of bacterial antigens enter in contact with the bloodstream, which happens when the microbial population derived from a severe infection exceeds a threshold. This initiates the early signaling events leading to the deleterious inflammatory response. The immune system recognizes extracellular molecules from microorganisms. The best-characterized bacterial-derived antigen is endotoxin or bacterial lipopolysaccharide (LPS). The presence of endotoxin in the blood is known as endotoxemia. LPS is a molecule derived from the outer membrane of gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium* (Fig. 1), and it is the best-characterized bacterial antigen in immunology. However other molecules, such as the lipoteichoic acid (LTA) present in the cell wall of gram-positive bacteria, or ergosterols derived from the cell wall of fungi, are also capable of activating the immune system. Additionally, cases of sepsis are clinically dissimilar depending on the bacterial stimulus that triggers the phenomenon. These differences can be found especially between sepsis associated with gram-positive and sepsis associated with gram-negative bacteria (6). Incidence of sepsis due to gram-positive bacteria increased from 10 % in the 1960s and 1970s, to 30 % in the subsequent years (3).

The next step in the sequence of phenomena that leads to sepsis is the recognition of bacterial antigens by the immune system. The concentration of circulating antigens required for an important activation of the monocyte/macrophage (Mo/M $\phi$ ) system, depends on the infection type, magnitude, and location.

Once activated Mo/M $\phi$  produce and secrete a variety of soluble factors that in turn, activate other cell types. The best-characterized factors are peptide hormones with pro-inflammatory activity, inflammatory cytokines: Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1-beta (IL-1  $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). These cytokines, directly or indirectly, cause a series of alterations at a cellular level, first in the vascular and immune systems, and then in the remaining tissues (7).

CD4+ T cells (Tc) present in lymphoid organs also recognize bacterial antigens processed by antigen-presenting cells. As a response, they expand

(proliferate) and differentiate. The cytokine production pattern is essentially pro-inflammatory in the first phases of infection, which in CD4+ T cells (CD4+ Tc) induces an effector response also called **Th1**, after they migrate to the periphery to meet the antigen (7). T lymphocytes also secrete cytokines that activate the M $\phi$  (IFN- $\gamma$ , IL-12), thus promoting inflammation (8). Factors determining the type of response of CD4+ Tc are unknown, but this may be influenced by the type of pathogen, the size of the bacterial or infective inoculums and the infection site (9)

### ACTIVATION OF MACROPHAGES

Macrophages (M $\phi$ ) play an important role in the inflammatory and immune response of an individual against foreign organisms and in the reaction to autologous and external material (10). In the immune response, M $\phi$  identify, process, and present antigens to the CD4+ Tc, which also secrete inflammatory cytokines, and participate as effector cells against microorganisms and tumor cells.

Macrophages are particularly important against infection because they can rapidly phagocytose any foreign element and furthermore entire microorganisms (11). These cells present highly active absorbent endocytosis, and express a large variety of membrane molecules that promote cellular internalization of foreign elements covered by antibodies. Some molecules that participate in recognition and phagocytosis also trigger transduction cascades, which results in the expression of genes, e.g. inflammatory cytokines (11). The production of IL-1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  by human monocytes is directly related to the binding of Fc- $\gamma$  receptors to their ligand (12).

M $\phi$  also exhibit highly glycosylated proteins on their surface, which specifically recognize bacterial antigens. The type 1 mannose receptor recognizes membrane molecules of bacteria and fungi and mediate phagocytosis of yeasts and other microorganisms (13). An important membrane protein expressed by M $\phi$  is **CD14** (see below), a glycoprotein of 55 kDa bound to the membrane by a phosphatidyl inositol anchor (14). CD14 is a molecule widely distributed in different cell types of the immune system (15).

### Events triggered by LPS

There are more than  $2 \times 10^6$  LPS molecules in a bacterium wall. Approximately 25 % of the fatty acid chains of the whole bacterial membrane are structurally associated with this molecule (16). The primary antigenic structure of LPS is its most conserved portion: **lipid A** (Fig. 1)

In the bloodstream, endotoxin is captured by **LPS binding protein** (LBP), a glycoprotein of 60 kDa that carries and facilitates the binding of LPS to their receptors. LBP is synthesized in the liver as an acute phase protein. The binding of LPS to LBP increases its activity almost one thousand times (17).



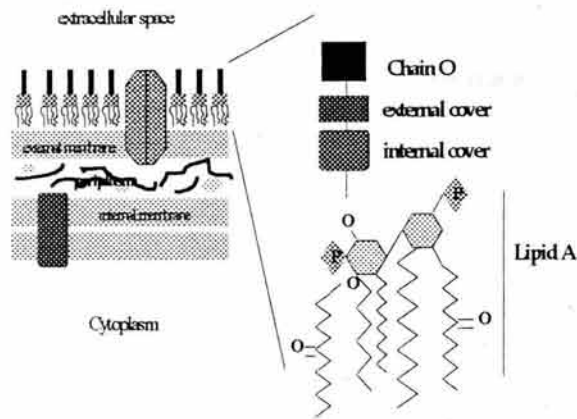


Figure 1.- Bacterial lipopolisaccharide (LPS) structure and its localization in the bacterial external membrane.

For many years it was supposed that CD14 was the direct receptor of LPS; however, several studies have revealed that LPS binding to the cell surface, in absence of CD14, was enough to activate cells in culture (18)

### Toll-like receptors

Recently, surface molecules responsible for direct recognition of a large variety of bacterial antigens (including endotoxin) were identified: the **Toll-like receptors** (TLR). The **Toll receptor** is a molecule associated to differentiation and defense mechanisms characterized in *Drosophila*. The mammalian toll-like family of proteins exhibits a high homology with Toll in the **Toll signaling domain**. Therefore the TLRs belong to a super family of receptors, as aligned at this domain. TLR are homologues to the **IL-1 $\beta$  receptor family** (19). Toll-like receptors have been the focus of attention of biochemical and cell research during the past 10 years because they constitute the missing link in the transduction system activated by endotoxin in mammalian cells (20).

The Toll domain is a *protein-protein interaction domain* that supports signal transduction. The IL-1 $\beta$  receptor (IL-1R) also has a Toll domain, and was initially considered a member of the TLR group. *In vitro* experiments suggest that transduction pathways activated by LPS and IL-1 $\beta$  are very close (21) (22), because some of their components can be exchangeable in complementation experiments, i.e. several proteins associated with the IL- $\beta$  receptor (TRAF6, IRAK) can be replaced with TLR associated proteins (23)

The molecule that specifically recognizes LPS is **TLR4**. It was the first member of the TLR family identified and was cloned from the *lps* locus. Since the 1970s it was known that homozygous mutations in this locus confer resistance to endotoxin. **TLR2** is another member that recognizes non-classical bacterial antigens, such as LTA and peptidoglycan present in gram-negative and gram-positive bacteria. It is the mediator of the response to lipoproteins derived from *Mycobacterium*

*tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* and *Mycoplasma fermentans* (24, 25), and LPS derived from *Leptospira interrogans* (26). Its specificity is defined by the ability to form heterodimers with other members of the Toll family such as TLR6, TLR1 or TLRX.

Another receptor that participates in the recognition of pathogenic agents is **TLR9**, which binds to bacterial DNA (27) and is expressed in large quantities in the spleen. It is currently unknown whether naked DNA can bind directly to TLR9, but the non-methylated CpG dinucleotide is used as ligand for *in vitro* studies (28). M $\phi$  from TLR9-deficient knockout mice lose the ability to produce inflammatory cytokines when stimulated with CpG and, more important, these animals do not develop septic shock after a significant inoculum of CpG. TLR9 are fitted to the **MyD88** adapter protein and to **NF- $\kappa$ B** (nuclear factor kappa B) pathway, and induce the production of IL-12 in monocytes and dendritic cells (29). It has been proposed that TLR9 is involved in intracellular pathogen recognition as a receptor inserted in intracellular vesicle membranes (30).

Ten different mammalian TLRs have been described. TLR1 and TLR6 do not signal as separate entities but act in cooperation with TLR2. TLR3, TLR5 and TLR9 exhibit the narrowest ligand specificity, and no natural ligand has been described yet for TLR7 (Fig. 2). No function is yet known for TLR8 and TLR10 either.

### Activation mediated by other bacterial antigens

Once recognized by the M $\phi$ , antigens of infectious agents represent the most important source of inflammatory and immune activation that result in septic shock. Most of the literature is focused on LPS. However, there are numerous other antigenic molecules involved in bacterial antigen recognition by the M $\phi$ .

Antigens of *Staphylococcus aureus* (**protein A** and **muramic acid**) are capable of activating monocytes in culture and of stimulating the production of large quantities of IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (8). The main antigens derived from gram-positive microorganisms, are LTA and peptidoglycan. A natural product of the peptidoglycan structure, with more activity than peptidoglycan itself, and actually constituting its antigenic portion is fragment N-acetylglucosaminyl-1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-m-diaminopimelyl-D-alanine (G(Anh)MTetra). This fragment seems to function as amplifier of the LTA-induced response, with a less conserved structure (31). G(Anh)MTetra also induces the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6, in cultured human monocytes through a pathway which is sensitive to tyrosine protein kinase inhibitors (H7) and is LPS dependent (32).

### Transduction pathway coupled to Toll-like receptors

The schematic representation of the response to LPS describes a picture in which LBP is the carrier molecule, CD14 is the membrane protein that recognizes the

years (48) (49, 50).

The importance of NF- $\kappa$ B in the development of septic shock became evident in experimental procedures in animals and *in vitro* studies demonstrating that different inhibitors of its activity interrupt the event sequence that trigger sepsis. For example, the administration of the antioxidant agent pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) protects mice against the administration of a lethal dose of LPS without affecting the production of IL-1 $\beta$  or IL-6, or the infiltration of lymphocytes in tissues. Other *in vivo* studies revealed that PDTC inhibits the expression of genes of pro-inflammatory proteins (TNF- $\alpha$ , COX-2, ICAM-1) by directly affecting the translocation of NF- $\kappa$ B to the cell nucleus (51).

Experimental animal protocols have also revealed that innate response to septic shock is related to the function of members of the NF- $\kappa$ B family. For example, transgenic mice with increased production of subunit p50 of NF- $\kappa$ B, whose heterodimer suppresses transcription, present a phenotype of tolerance to LPS. Apparently, tolerance is associated with low TNF- $\alpha$  production in response to endotoxin and a slight activation of the vascular endothelium (52). Another experimental evidence is the resistance to septic shock after inoculation with LPS in mice with a mutation of the gene for the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP), which confers deficiency in NF- $\kappa$ B translocation (53).

It is interesting that LPS alone induces translocation of NF- $\kappa$ B and the subsequent endothelial activation in an equivalent form to activation mediated by inflammatory cytokines. LPS-mediated activation of monocytes and M $\phi$  results in the secretion of inflammatory cytokines that activate the endothelial system. The endothelium is thus the target tissue of both the primary effector (LPS) and its by-products. In this context, it is possible then that the intensely exacerbated and generalized response of the endothelial system results from the exposure to redundant signals during early events of endotoxemia and septicemia.

In consequence, the importance of NF- $\kappa$ B as therapeutic target has increased with the development of new non-steroid anti-inflammatory drugs, many of which have ability of regulating with NF- $\kappa$ B as a main effect. In particular, substances such as sulfasalazine, acetylsalicylic acid and leflunomide, inhibit the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus both *in vivo* and *in vitro*. Some of these drugs, however, require high concentration to achieve efficient inhibition of the transcription factor (54).

### Secretion of proinflammatory products

Once activated, M $\phi$  are the fundamental secretory cells of the immune system. More than one hundred M $\phi$  products with very diverse molecular weights, ranging from 32 Da (superoxide anion) to 440,000 Da (fibronectin), have been identified (55). Among the most studied M $\phi$  products are pro-inflammatory cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6.

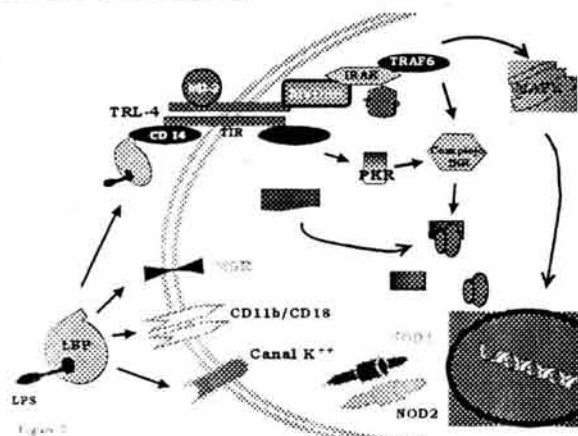


Figure 3.-The transduction pathways activated by LPS. Canonic Myd88-dependent -pathway

TNF- $\alpha$  was purified from conditioned media of the murine M $\phi$  cell line RAW 264.7, searching for the protein mediator of the cachexia that characterizes chronic diseases and tumor hemorrhagic necrosis (56) (57). It has been demonstrated that TNF- $\alpha$  constitutes roughly 1 % of the protein products secreted by RAW cells activated with endotoxin (58).

IL-1 $\beta$  was also purified from products secreted by monocytes cultured with LPS. IL-1 release, a tightly controlled process, requires induced synthesis of a 269 aa precursor (pro-IL-1 $\beta$ ), and a second stimulus that initiates cleavage and secretion of the 153 aa mature form (32).

IL-6 was initially purified from soluble products of cells immortalized with the Epstein-Barr virus and then identified in the secretion products of activated monocytes (59).

**Interleukin-12** is another product of M $\phi$  that is important in sepsis pathogenesis. The main targets of IL-12 are the NK (*natural killer*) and T cells, which respond with the secretion of IFN- $\gamma$  and thus activate the M $\phi$  and induce the secretion of pro-inflammatory cytokines. In consequence, IL-12 participates in the amplification of the inflammatory and immune response, essential in the development of septic shock and multiple organ failure (60).

Also, the intermediary metabolites of the arachidonic acid pathway constitute an important product of the oxidative metabolism of M $\phi$ . **Leukotrienes, thromboxanes, prostaglandins and prostacyclins** play an significant role in the regulation of vascular tone, inflammation, and reduction of systemic vascular resistance, characteristic of the early (*hyperdynamic*) phase of septic shock (61). A number of *in vitro* studies on the secretion of **prostaglandin 2E (PGE2)** and the participation of the enzyme **cyclooxygenase-2 (COX-2)** in PGE2 synthesis have been reported. LPS is capable of synergistically inducing the expression of pro-inflammatory cytokines in M $\phi$  that have been previously treated with PGE2, and pro-inflammatory cytokines may also induce the release of PGE2 (62).

M $\phi$  produces other protein mediators, such as interferons, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IL-18,

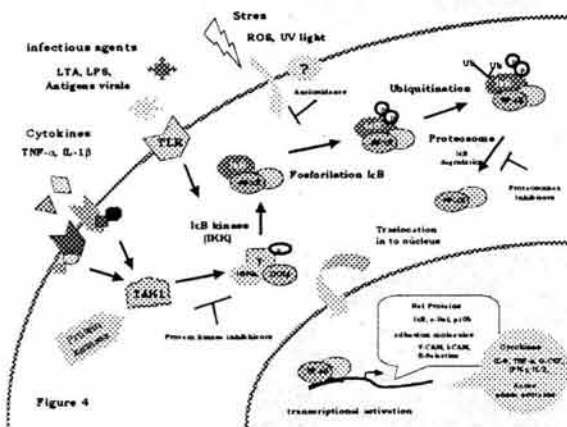


Figure 4.-The complex NF- $\kappa$ B transcription factor regulation. The three major receptor-associated-pathways are shown. NF- $\kappa$ B nuclear translocation depends on the degradation of its inhibitor ( $\kappa$ B)

plasminogen activator, tissue factor (TF) platelet activating factor (PAF), IL-8, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and many others (63). Biological functions of these cytokines and chemokines are multiple, redundant and interactive (64). These multiple biological functions and interactions (*pleiotropic* functions), suggest the participation of various cell types mediated by a considerably complex network of regulations. The large variety of products secreted by the M $\phi$  acts on different cell populations inside and outside the vascular system and regulates, at various levels, the sequence of events that define sepsis.

## ACTIVATION OF DIFFERENT CELL POPULATIONS IN SEPSIS

### Activation of vascular endothelium

The endothelial system is the interface between the bloodstream and the tissues and represents a non-thrombogenic and anticoagulant barrier for blood flow. Consequently, it is the primary target of nearly every product secreted by circulating cells (65). The activation of the endothelial system is a semi-differentiated condition that occurs as part of the inflammatory and pro-coagulant response. It is characterized by adhesion, diapedesis and cell infiltration (66). It is accompanied by biochemical and structural alterations that initiate with the expression of a large amount of genes, particularly those that code for **adhesion molecules**. These molecules are essential for edema formation and the massive cell infiltration observed in septic shock. They promote the recruitment and of lymphocytes, neutrophils, monocytes and other cells observed in large areas of the microvasculature (67). An interesting *in vitro* observation has been the sequential expression of adhesion molecules in the endothelium (68): the first molecule to be exposed at the cell surface is **E-selectin**, which predominantly binds to neutrophils, followed by **ICAM-1**, which binds to monocytes, and, finally **VCAM-1**, which participates in the adhesion to T cells. The NF- $\kappa$ B-dependent expression of the adhesion

molecules during the endothelial activation has been extensively studied (69) Some *in vitro* studies in which protein kinase inhibitors and NF- $\kappa$ B inhibitors were used revealed that the expression of adhesion molecules is inhibited by blocking the signal transduction pathway activated by TNF- $\alpha$ . However, clinical trials with neutralizing antibodies against adhesion molecules (E-selectin and P-selectin) designed to reduce the damage produced by LPS have not been successful (70).

Endothelial activation has essential effects on thrombin formation by pathways independent of adhesion molecules. The endothelial cell synthesizes and secretes **coagulation cascade factors**, particularly factor V (71), factors Xa and Xia. It also secretes the binding molecules for factors IX, Xa and VIIIa, which facilitate the formation of the prothrombinase complex (factor Xa, Va, prothrombin). It additionally produces the plasminogen activator inhibitor (PAI-1), essential in the inhibition of fibrinolysis and thrombus dissolution processes.

The endothelium also secretes inflammatory cytokines that amplify the inflammatory response at a cellular level. For example, it has been shown that these cells when activated by inflammatory cytokines produce TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-1 as part of a mechanism of autocrine regulation. The production of IL-6 is particularly important in the endothelium because it amplifies intracellular signals received from the outside (72) That is to say, the endothelium, as syncytium, extends the inflammatory signals along the broad regions of the blood vessels, a transcendent phenomenon that could explain the generalized expression of sepsis. Moreover, it has been described that the endothelial cell, when stimulated by LPS, secretes neutrophil-activating factors such as chemokine alpha, IL-8, and other factors with different cellular targets (73).

### Induction of acute phase proteins in the liver

The global response of the body to microbial agents includes the expression of **acute phase proteins**. Most circulating acute phase proteins are secreted in the liver in response to the IL-6 produced by liver-resident macrophages (*Kupffer cells*). The result is a significant increase of circulating fibrinogen, decrease in production of albumin and proteins of the enzymatic complex cytochrome P450, and increase in concentration of serum amyloid, fibrinogen, metallothioneine-1, antichymotrypsin,  $\beta$ -2-macroglobulin, haptoglobin, hemopexin and other proteins involved in transportation, coagulation system and tissue remodeling processes (74).

In addition, there are other hepatic effects: an increase in the expression of LDL receptor, resulting in a reduction of circulating cholesterol and fatty acids. Serum amyloid A replaces apolipoprotein A, a component of the high density lipoprotein particles (75), which produces a change in the destination affinity of these carrier molecules, biased towards activated macrophages, which may use these particles as a preferential source of energy (16).



## Damage and infiltration in epithelia

Gram-negative bacteria may directly invade and destroy epithelia that are in contact with the exterior, but the soluble mediators produced as a result of the infection may also affect them. Recently, it was observed that invaded epithelia also produce inflammatory molecules. In fact, LPS can stimulate the production of PGE2 in many cellular types. The production of epithelial PGE2 stimulates the expression of CD14 receptor in macrophages, and the epithelium invasion amplifies the ability of the immune system to respond. This effect of PGE2 has also been observed in spleen, kidney and liver (15).

Bacterial adhesion to epithelia contributes to damage and abscess formation. The primary binding of bacteria to epithelia near the infection site is facilitated by the TNF- $\alpha$ -mediated expression of ICAM-1. Also, this increases the recruitment of lymphocytes and polymorphonuclear cells facilitating the formation of lesions. During infection, epithelia produce chemokines and adhesion molecules that facilitate cellular infiltration. The *in vivo* administration of neutralizing antibodies against IL-1 or TNF- $\alpha$  may reduce the damage in intra-abdominal sepsis protocols (76). *In vivo* studies have demonstrated that IL-1 receptor knockouts present higher epithelial integrity in lung, as well as a lower neutrophil infiltration after the inoculation with endotoxin (77).

The deep epithelial damage that is occasionally observed during septic shock is also produced by the induction of apoptotic cell death (see definition below) mediated by inflammatory cytokines. For example, it has been observed that apoptotic death in lung epithelium cells is related to high levels of circulating TNF- $\alpha$ , where it triggers a transduction cascade activating a program of cell death mediated by caspase proteins (78). Inflammatory cytokines are also capable of inducing *in vitro* death by necrosis and apoptosis in kidney epithelium. The stimulation with TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  or IL-1 $\beta$  induces apoptosis and DNA fragmentation in cell cultures derived from proximal tubule epithelium of human kidney (79).

## Fever induction

The molecular mechanisms that underlie its induction have not been completely elucidated. Inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 constitute pyrogenic messages recognized by the central nervous system (CNS) (80). The brain region that regulates body temperature is the preoptic area in the anterior hypothalamic region. The molecular mechanisms of these signal transductions in the CNS are still unknown (81). Even though it is not well known how much of these mediators pass through the blood-brain barrier, three other possibilities of inflammatory signal recognition by the central nervous system have been demonstrated (82, 83). There is active cytokine transport from the vasculature to the nervous tissue tissues around the brain ventricles (84), as well as a neural pathway constituted by vagal afferents, clearly involved in fever induction (83). Moreover, the production of signals by endothelial cells in the cerebral

microvasculature (perivascular microglia) or by meningeal macrophages capable of secreting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  has been reported (83, 85). The involvement of endothelial signal transduction in the CNS in fever induction by circulating inflammatory cytokines has also been established (85).

## Activation of T lymphocytes

When stimulated by bacterial antigens, CD4+ T cells differentiate into suppressor cells, (i.e. cells responsible for the inhibition of pro-inflammatory cytokine production) they deactivate macrophages and hamper inflammation and its deleterious consequences. This response is regulated by the activation of CD4+ T lymphocytes, and is therefore in charge of regulating the damage produced by inflammatory cytokines.

The activation of CD4+ T lymphocytes is essential during the cascade of events of sepsis because it inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines by the macrophages and deactivates them. The secretion of anti-inflammatory cytokines (86), such as IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , IL-1RA (the antagonist of IL-1 receptors), IL-13, and other cytokines, characterizes this suppressor response also called Th2 type response (87). They normally intervene after the secretion and function of pro-inflammatory cytokines. Their effect is to block the production and reduce local concentration of pro-inflammatory cytokines (88). This phenomenon is generally local and both types of cytokines are in concentrations not detected in peripheral blood. Only if the antigenic stimulus persists after a first local production of inflammatory cytokines another induction event may occur leading to a massive activation of regional endothelium, subsequently resulting in generalized endothelial activation (89), (Fig. 5). That is to say, an inhibitory cascade follows the inflammatory cascade activated after an invasive stimulus. These inhibitory signals are part of a regulatory arrangement that normally allows the immune system to decay after an initial activation.

For this reason, an imbalance in the regulation of inflammatory and anti-inflammatory cytokines may account for the resistance or susceptibility of a particular infective agent or, even more, the development of cellular molecular events that are clinically expressed as the generalized response inflammatory syndrome or its lethal consequences: septic shock and multiple organ failure.

## ACTIVATION OF THROMBOTIC PROCESSES

### Adhesion, cellular infiltration and edema

Massive edema is a prevalent condition in sepsis. Its formation is facilitated by cellular infiltration of lymphocytes and neutrophils as a consequence of chemotactic migrations. Cytokines with chemotactic properties, collectively named **chemokines** and which also participate in angiogenesis and tissue remodeling, are mainly responsible for this phenomenon.

Chemokines are soluble proteins of low molecular weight

that have a conserved cysteine domain, which is the basis of their classification in alpha (C-X-C) and beta (C-C) chemokines (90). The chemokines best-characterized in acute and generalized inflammation are IL-8, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , RANTES and MCP1-3 (91). Chemokines interact with cell receptors that have a structure of seven transmembrane domains associated with G proteins and they activate transcription signals in circulating cells (92).

In patients with sepsis, neutrophils predominantly express CXCR1 receptor of alpha chemokines, in comparison with other receptors such as CXCR2 and ENA-78. The implications of this finding on cellular infiltration in sepsis have not been determined yet (90). However, the **capillary leak syndrome**, an imbalance in the cellular infiltration, is a frequent condition associated with generalized edema observed in patients with sepsis,

The endothelial cell has an important function in the massive entry of fluids into the tissues. Differences in the distribution of **intracellular adhesion molecules** after exposure to LPS have been observed. That is, the **tight junctions** between cells of the vascular tree system suffer modifications as part of the reorganization of **occludins** (components of the *tight junctions*), **connexins** (*gap junctions*) and **cadherins** (*adherence junctions*), and of cytoskeleton molecules. This series of modifications facilitate diapedesis (93). The reorganization of the endothelial cell structure also facilitates the entry of fluid into the tissues (94). Inflammation factors as TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , thrombin, histamine, LPS, and PAF, also allow the entry of fluid, cellular infiltration and the formation of generalized edema observed in patients with septic shock (95).

### Disseminated intravascular coagulation

The capillary congestion observed during septic shock produced by the coagulation system does not depend exclusively on the endothelial system. High concentrations of prothrombin, thrombin-anti-thrombin complex (96), plasminogen activator inhibitor, plasmin-2-anti-plasmin complex, and some markers of endothelial activation as von Willebrand factor (65), have been found in patients with sepsis. The presence of these factors is reflected in the activation of the coagulation cascade in various areas of the microvascular system. Similarly, the hepatic production of acute phase proteins contributes to the systemic hypercoagulability (97).

One of the major regulatory mechanisms operating in the blood coagulation cascade is the **thrombomodulin-protein C anticoagulant pathway**. It consists of thrombin, thrombomodulin, protein C (PC) and protein S (PS), and is initiated when the circulating zymogen PC is converted to activated PC (APC) by a thrombin-thrombomodulin complex on the surface of endothelial cells. The formed APC in the presence of its co-factor PS, downregulates the coagulation cascade by proteolytic inactivation of the procoagulant cofactors Va and VIIIa, and also enhances the fibrinolysis system by inhibition of plasminogen activator inhibitor 1. PS circulates in plasma in two forms in dynamic

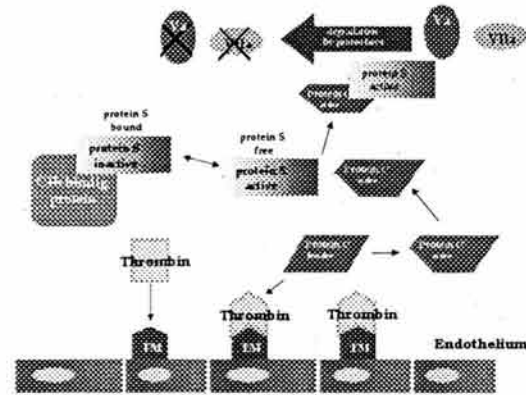


Figure 5.- Anti-coagulating pathway is inhibited during sepsis by reduction of protein C activity and inhibition of protein S.

equilibrium. One is the free protein (approximately 40% of total PS in normal plasma) which has the APC cofactor activity. The other is reversibly complexed to C4b-binding protein (C4bp), a regulatory component of the complement system. When bound to C4bp, PS can no longer function as a cofactor of APC. Since PS-C4bp complex formation is regulated by the law of mass action, elevation of C4bp leads to reduced levels of free (active) PS (Fig. 6). In comparison with antithrombin III, heparin cofactor II contributes less to neutralization of thrombin and has higher affinity to dermatan sulfate on the surface of vascular smooth muscle cells (98, 99).

During sepsis, protein C activity is significantly reduced, either by acute consumption or by thrombomodulin down-regulation, and increased levels of plasma C4bBP inhibit protein S.

### VASCULAR TONE AND REDUCTION OF BLOOD FLOW

#### Lost of systemic vascular resistance

Genes encoding the enzyme synthase of the **nitric oxide radical (NO)** are synthesized during endothelial activation (100). Three types of **nitric oxide synthase (NOS)** enzymes have been described: NOS1, expressed in neural cells, NOS2 (inducible NOS) calmodulin-dependent and expressed in macrophages, and NOS3, expressed in the endothelium in response to inflammatory cytokines (101). This latter enzyme catalyzes the synthesis of citrulline and NO from L-arginine. Their activity depends on various co-factors (FADH, NADH), and has a heme group in the active site. Most vasodilatation activity of the endothelium depends on its function (102). NO production is mainly responsible for the loss of systemic vascular resistance and the subsequent relaxation of vascular system smooth muscle, both of which characterize the early phases of the septic shock. NO (formerly named endothelium-derived relaxing factor) is a molecule with very short half-life that by accumulation acquires the ability to diffuse from the endothelium to the muscle cells. In these cells, NO activates the soluble enzyme **guanylate cyclase** that increases intracellular concentration of **cGMP** and activate the pathway of the kinases of the PKC family (103). Acetylcholine muscarinic receptors and bradykinine, dopamine and endothelin receptors may participate in the increase in NO production (104).



NO is a regulator of vascular tone homeostasis and its production is finely regulated by both pathological and physiological conditions. In fact, a number of vasoactive substances promote its release in conditions different to those of endotoxemia and sepsis, and contribute in the participation of the NO in acute and local or systemic and prolonged manifestations (105).

Based on the former concepts, the proposals to intervene the effects of NO to generate beneficial effects in different situations of human disease, including septic shock can be understood. For instance, endothelial NOS inhibitors may block some of the cardiovascular effects of NO. In this respect, it has been observed that some inhibitors, such as L-canavanin, partially protect against endothelial damage and, in certain cases, increase vascular survival in septic shock (106). NO synthesis inhibitors, such as L-N(G)-monomethylarginine, also affect endothelial activation directly in experimental systems with endothelial cells without affecting NF- $\kappa$ B translocation; however, these studies have revealed that IL-6 production decreases, which suggests that NO, in addition to be produced by the endothelial cell, is directly involved in its homeostasis (107).

Another vascular tone regulator, prostaglandin E<sub>2</sub>, is an intermediate of the arachidonic acid pathway. The cyclooxygenase-2 enzyme, whose gene (COX-2) is also transcribed during endothelial activation, is involved in its synthesis. Along with the endothelium, macrophages represent an important source of NO and prostaglandins (108). Cyclooxygenases are rate-limiting enzymes that initiate the conversion of arachidonic acid to prostanoids. It has been demonstrated that IFN- $\gamma$  alone or in synergy with LPS or IL-1 $\beta$ , induces the expression of the COX-2 gene in macrophages, which results in increased levels of the enzyme and prostaglandin 2E (109). Regulation of the COX-2 enzyme represents an important event during the pathological issues or prostanoid-mediated inflammation and during the hyperdynamic phase of the septic shock.

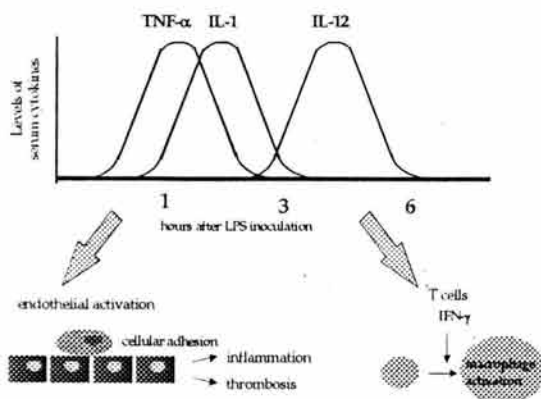


Figure 5

Figure 6.-Kinetics of cytokine production during the early sepsis events. Two major cytokine peaks can be detected that correlate to Th1 and Th2 phases respectively

## Myocardial depression and cardiac biventricular dysfunction

Sepsis and septic shock are generally accompanied by myocardial dysfunction. Currently, there are no reasons to consider myocardial dysfunction as a pre-terminal or terminal condition of sepsis. Evidenced by biventricular dilatation and a fraction of reduced ejection, myocardial dysfunction exists despite a hyperdynamic condition dependent on the high input of fluids that persist in patients with septic shock until death or recovery. In survivors, cardiac function recovers in 7 to 10 days. Cardiac dysfunction does not seem to be secondary to myocardial hypoperfusion, but to circulating depressor factors, primarily TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and at cellular level, to nitric oxide-dependent and -independent mechanisms.

Experimental protocols have revealed that TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  reduce contractility, alter Ca<sup>++</sup> homeostasis and induce myocardiocyte death (110). These effects may account for the myocardial dysfunction that characterizes sepsis and septic shock, specifically for the severe reduction of the ejection fraction of the left ventricle and of subsequent myocardial dilatation.

**Apoptosis** or programmed cell death is a process different to necrosis that requires a suicide program as a response to certain specific stimuli (111). TNF- $\alpha$  induces myocardial apoptosis. TNF-induced apoptosis of myocardiocytes occurs by a TNFR1 receptor-dependent mechanism. The process is late in the course of cardiac degeneration. Before apoptosis, two stages of contractile dysfunction are identified: one is immediate and the other is retarded and they are nitric oxide-dependent and independent, respectively. *In vitro* studies have demonstrated that in the early phase, TNF- $\alpha$ -induced myocardial functional depression is mediated by the increase in sphingosine concentration. This phospholipid, involved in the transduction pathway activated by the TNFR1 receptor, blocks the Ca<sup>++</sup> release channels of the sarcoplasmic reticulum producing contractile dysfunction of the cardiac cell. All this happens a few minutes after stimulation with TNF- $\alpha$ . The late phase apparently depends on NO synthesis, by action of the iNOS enzyme. The enzyme expression temporarily correlates with dysfunction and its inhibition increases the recovery or prevents cardiac dysfunction produced by inflammatory cytokines (IL-1 and TNF- $\alpha$ ) (112).

Beside its effects on Ca<sup>++</sup> homeostasis in the heart, TNF- $\alpha$  also produces myocardial dysfunction by inducing an increase in oxidative stress, cytotoxicity and induction of apoptosis in myocytes.

It is important to mention that the cells responsible for the production of TNF- $\alpha$  that directly affects myocardial functions are heart-resident M $\phi$  that have been activated by endotoxin and myocardiocytes as response to a pro-inflammatory cytokine stimulus (113).

## METABOLIC ALTERATIONS

In the continuous course of sepsis to septic shock, a series of severe alterations in the patient's energetic

metabolism is observed (114). Sepsis is accompanied by generalized weakness and anorexia. The input of consumed net energy decreases and, paradoxically, there is an increase in caloric output of 40 % to 90 % in situations of no physical activity (resting metabolic output) depending on the type of infection present. Usually, sepsis leads to a marked catabolic decrease of body mass (115).

Hyperglycemia is observed during the first hours of the septic shock followed by severe hypoglycemia that lasts for 24 to 48 hours or more. The early condition occurs as the result of the circulating insulin concentration and glucose intake; however, the severe hypoglycemia observed subsequently does not depend on these changes (116). Alterations in protein metabolism also occur, characterized by an increase in nitrogen excretion rate associated with muscle mass.

It is well known that there is an increase in glycolysis and a decrease in gluconeogenesis during septic shock. Inflammatory cytokines and endotoxin may directly alter the cell energetic intake (110). Studies with animals have revealed that treatment with endotoxin reduces the total activity of gluconeogenic and glycolytic enzymes, such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), in the liver in a relatively short time, for example, 4 hours (117).

Studies using muscle cell cultures have revealed that TNF- $\alpha$  directly increases the activity of glycolytic enzymes, which then operate in irrelevant energetic cycles that result in an elevated consumption of glucose (84). That is, TNF- $\alpha$  activates various ATP direct depletion mechanisms increasing the activity of the enzymes phosphofructokinase (PFK) and fructose bisphosphate phosphatase (FBP) and consuming fructose 6-phosphate and fructose 1,6-disphosphate. The result is a significant increase in cell energetic output (118). Studies with animals revealed a reduction in the activity of the mitochondrial respiratory chain produced by a drop in the activity of respiratory complexes I and II, in ratios of 15 % to 120 % of reduction in the various carriers and enzymes (119).

Hyperlactatemia is another metabolic condition observed in the hypermetabolic state of septic shock. The mechanism responsible for this alteration is the elevated concentration of circulating lactic acid due to a deregulation of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex (120).

## SHOCK AND DEATH

The body suffers a series of severe aggressions at different levels during septic shock. Multiple organs suffer generalized inflammation, disseminated intravascular coagulation, and generalized cellular metabolic blockage that end up in multiple organ failure and death (121). The capillary congestion, vasodilatation and cardiac failure phenomena reduce the blood flow to tissues. Infiltration and activation of neutrophils and other cells produce damage to biological membranes, specifically, the microvasculature endothelium. Lungs and liver are particularly susceptible to damage produced by cellular infiltration. Pulmonary damage results in the syndrome

of progressive respiratory failure, in which tissue fluids leak from the blood into the alveolar air space due to the lesions in the endothelium caused directly or indirectly by sepsis. Hepatic damage produces functional failures that result in the difficulty to maintain adequate blood glucose levels (gluconeogenesis is inhibited). In the kidneys, epithelial damage is due to the reduction of blood perfusion (122).

Overproduction of NO by macrophages and cardiac myocytes leads to cardiac failure and loss of general organ perfusion with subsequent hemodynamic shock as the result of blood flow reduction (95).

Hypoglycemia, the irreversible loss of blood pressure, metabolic blockage and cardiac failure are clinical features of septic shock. This constellation of symptoms usually has lethal consequences.

## CONCLUSION and clinical considerations

Sepsis is an archetypal example of a self-regulating complex system, with multiple cascading non-linear interactions and feedbacks. Various cascades of events develop from the first stages of the infection: transduction of intracellular signals that result in the expression of genes, subsequent processes of activation and even of cellular differentiation that occur in relatively short periods, and modifications at different levels, from cellular to tissular. Most of these are irreversible and only turn off once the cycle is completed.

The fact that amplifiable cascades regulate these events at a molecular level allows their expansion from the infection source to the whole body, until these are inhibited by regulatory events of the same immune system (anti-inflammatory cytokines, degradation of effector molecules, and inactivation of macrophages). This autoregulatory feedback, and its physiological timing, must be having in thought for the clinical treatment.

For a long time, a "magic target" or a sole molecule essentially involved in the pathogenesis of sepsis has been sought after to be used as the target of therapeutic strategies; however, septic shock is a multiple factor phenomenon, extremely complex and with multiple phases.

When TNF- $\alpha$  was identified as protein effector of cellular phenomena during septic shock, treatment attempts were addressed to inhibit or neutralize cytokine with antibodies, soluble receptors or inhibitors (123). Similarly, bacterial endotoxin inhibitors (e. g., polymyxin B, antagonist peptides, or monoclonal antibodies) have been tested without success. In recent years, NF- $\kappa$ B activation inhibitor drugs have been used, albeit without convincing results. The administration of antibiotics to directly control the infection should be evaluated carefully, since it may promote microorganism lysis and, thus, an increase in the level of circulating endotoxin (124). The early administration of adequate antibiotic therapy, effective source control, and goal-directed hemodynamic resuscitation constitute the cornerstone of successful management. Prevention of the complications of critical illness and maintenance of normal glucose levels are also important elements of effective management (125). Generally, no drug has yet shown determinant individual

effects.

For instance, inflammation and coagulation are closely related to each other, so the inhibition of only one pathway, such as the inhibition of inflammation with high dosage steroids or the inhibition of coagulation with antithrombin, does not produce survival improvement (126). For example, the vascular system practically does not respond to vasoconstrictor or anticoagulant drugs due to the massive activation of the endothelium (127). One similar item occurs with the immune system cells (128).

In patients with vasopressor-dependent septic shock, evaluation for inadequate cortisol response and the provision of physiologic doses of replacement steroids for those found to be deficient might result in improved survival. Administration of *drotrecogin alfa* (an activated protein C form) has been shown to improve survival in patients with severe sepsis and septic shock who have a high risk of mortality and is the only Food and Drug Administration-approved therapy for severe sepsis (129). Additionally, positive results from trials of steroids and intensive insulin therapy have also been reported (130).

The efficient treatment of sepsis and its consequences, septic shock and multiple organ failure, is not as simple as formerly presumed. It is now clear that accurate knowledge is required of the time, space and transcendence of every one of the phenomena described above, in order to decide the type and form of intervention to acquire more opportunities for its control. Clinical management of sepsis and its lethal consequences, recommended even without the proof of the concept, consists in the administration of antibiotics, immune system stimulators and LPS inhibitors in the early phases (if these are timely identifiable), and cytokine antagonists with coagulation inhibitors, antioxidants and anti-inflammatory cytokines in the intermediate and late phases. Occasionally, the combined effect of all these agents may increase the chances of survival in some patients (131,132).

In any case, this proves that there is no magical molecular target for sepsis; furthermore, despite the efforts performed in basic and clinical research, accurate knowledge of the problem, its regulation, and pathogenesis still seems to be far to serve in the design of new therapeutic strategies that do in fact significantly decrease the mortality due to these syndromes.

## Acknowledgments

We thank Enrique Espinosa for critical review of the manuscript and encouraging discussions.

## References

- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296(5566):301-5.
- Levy MM, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530-8.
- Friedman G SE, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998;26(12):2078-86.
- Sifuentes-Osornio J G-AM, Ponce de Leon-Garduno LA, Guerrero-Almeida ML. Trends for bacteremia and risk factors for death in a tertiary hospital in Mexico City. 1981-1992. *Gac Med Mex.* 2001;137(3):191-202.
- Zamora-Castorena S M-d-SM. Five year experience with neonatal sepsis in a pediatric center. *Rev Invest Clin* 1998;50(6):463-70.
- Murphy K, Haudek SB, Thompson M, Giroir BP. Molecular biology of septic shock. *New Horiz* 1998;6(2):181-93.
- Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages. *J Leukoc Biol* 2000;68(5):707-14.
- Tufano MA, Cipollaro de l'Ero G, Ianniello R, Galdiero M, Galdiero F. Protein A and other surface components of *Staphylococcus aureus* stimulate production of IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma. *Eur Cytokine Netw* 1991;2(5):361-6.
- Abbas AK, Murphy, K.M., Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.
- Nathan CF. Macrophage activation: some questions. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1986;137C(3):345-51.
- Aderem A. How to eat something bigger than your head. *Cell* 2002;110(1):5-8.
- Abrahams VM, Cambridge G, Lydyard PM, Edwards JC. Induction of tumor necrosis factor alpha production by adhered human monocytes: a key role for Fc gamma receptor type IIIa in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(3):608-16.
- Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. Pneumocystis carinii cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kB activation. *J Biol Chem* 2003;278:2525-32.
- Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998;64(1):25-32.
- Iwahashi H, Takeshita A, Hanazawa S. Prostaglandin E2 stimulates AP-1-mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP-dependent protein kinase A. *J Immunol* 2000;164(10):5403-8.
- Hampton RY, Raetz CR. Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation. *J Biol Chem* 1991;266(29):19499-509.
- Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991;113(5):981-6.
- Hamann L, Schumann RR, Flad HD, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ. Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF-kappaB activation. *Eur J Immunol* 2000;30(1):211-6.
- Golenbock DT, Fenton MJ. Extolling the diversity of bacterial endotoxins. *Nat Immunol* 2001;2(4):286-8.
- Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001;98(5):1429-39.
- Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299(5615):2076-9.
- Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1999;274(12):7611-4.
- Guo F, Wu S. IRAK-2 and PI 3-kinase synergistically activate NF-kappaB and AP-1. *Inflammation* 2000;24(4):305-16.
- Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001;1(4):625-35.
- Akira S. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem Soc Trans* 2000;28(5):551-6.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*



- 2001;2(4):346-52.
27. Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001;2(1):15-6.
  28. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
  29. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
  30. Modlin RL. Activation of toll-like receptors by microbial lipoproteins: role in host defense. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4 Suppl):S104-6.
  31. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemeermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998;188(2):305-15.
  32. Dokter WH, Dijkstra AJ, Koopmans SB, Stulp BK, Keck W, Haije MR, et al. G(Anh)MTetra, a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 1994;269(6):4201-6.
  33. Yuan Q, Zhao F, Chung SW, Fan P, Sultzer BM, Kan YW, et al. Dominant negative down-regulation of endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production by Lps(d)/Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2852-7.
  34. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000;105(4):497-504.
  35. Bave U, Vallin H, Alm GV, Ronnblom L. Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun* 2001;17(1):71-80.
  36. Gingras, Helene L, F MJ. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Molecular Immunology* 2002;38(11):817-824.
  37. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000;165(7):3541-4.
  38. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;410(6832):1103-7.
  39. Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(22):12654-8.
  40. Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res* 2000;6(5):383-7.
  41. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 2000;19(13):3325-36.
  42. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr Biol* 1998;8(1):R19-22.
  43. Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):414-29.
  44. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3(3):221-7.
  45. Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999;18(49):6842-4.
  46. Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 1999;18(49):6845-52.
  47. Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(2):226-32.
  48. Lavon I, Goldberg I, Amit S, Landsman L, Jung S, Tsuberi BZ, et al. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med* 2000;6(5):573-7.
  49. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107(2):135-42.
  50. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001;107(1):3-6.
  51. Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *In vivo* expression of proinflammatory genes. *Circulation* 1999;100(12):1330-7.
  52. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998;102(9):1645-52.
  53. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 1999;18(16):4446-54.
  54. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-11.
  55. Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80(6):1550-60.
  56. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985;161(5):984-95.
  57. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989;7:625-55.
  58. Jue DM, Sherry B, Luedke C, Manogue KR, Cerami A. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* 1990;29(36):8371-7.
  59. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, et al. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon- beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988;239(4839):502-4.
  60. Assenmacher M, Lohning M, Scheffold A, Manz RA, Schmitz J, Radbruch A. Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28(5):1534-43.
  61. Aderem AA, Rosen A, Barker KA. Modulation of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. *Curr Opin Immunol* 1988;1(1):56-62.
  62. Fernando LP, Fernando AN, Ferlito M, Halushka PV, Cook JA. Suppression of Cox-2 and TNF-alpha mRNA in endotoxin tolerance: effect of cycloheximide, antinomycin D, and okadaic acid. *Shock* 2000;14(2):128-33.
  63. Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, Hayashi N, Adachi K, Nakano H, et al. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol* 2002;169(7):3863-8.
  64. Ayala A, Chaudry IH. Platelet activating factor and its role in trauma, shock, and sepsis. *New Horiz* 1996;4(2):265-75.
  65. Lopez-Aguirre Y, Paramo JA. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb Res* 1999;94(2):95-101.
  66. Maruyama I. Biology of endothelium. *Lupus* 1998;7(Suppl 2):S41-3.
  67. Huang K, Fishwild DM, Wu HM, Dedrick RL. Lipopolysaccharide-induced E-selectin expression requires continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal/permeability-increasing protein. *Inflammation* 1995;19(3):389-404.
  68. Hauser IA, Johnson DR, Madri JA. Differential induction of VCAM-1 on human iliac venous and arterial endothelial cells and its role in adhesion. *J Immunol* 1993;151(10):5172-85.
  69. Spiecker M, Darius H, Liao JK. A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol* 2000;164(6):3316-22.
  70. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefer AM. Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J Exp Med* 1999;189(6):931-8.
  71. Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV. Production of endothelium-derived contracting factor is enhanced after coronary reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1991;51(5):788-93.
  72. Graeve L, Baumann M, Heinrich PC. Interleukin-6 in

- autoimmune disease. Role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense. *Clin Invest* 1993;71(8):664-71.
73. Gill EA, Imaizumi T, Carveth H, Topham MK, Tarbet EB, McIntyre TM, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces endothelial cells to synthesize a degranulating factor for neutrophils. *Faseb J* 1998;12(9):673-84.
74. Derfalvi B, Igaz P, Fulop KA, Szalai C, Falus A. Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro. *Cell Biol Int* 2000;24(2):109-14.
75. Ray A, Hannink M, Ray BK. Concerted participation of NF-kappa B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. *J Biol Chem* 1995;270(13):7365-74.
76. Gibson FC, 3rd, Onderdonk AB, Kasper DL, Tzianabos AO. Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*. *J Immunol* 1998;160(10):5000-6.
77. Ferlito M, Romanenko OG, Ashton S, Squadrito F, Halushka PV, Cook JA. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J Leukoc Biol* 2001;70(5):821-9.
78. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V. Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor-kappaB induction by IL-1beta in epithelial and lymphoid cells. *J Immunol* 1997;159(11):5264-72.
79. Glynne PA, Evans TJ. Inflammatory cytokines induce apoptotic and necrotic cell shedding from human proximal tubular epithelial cell monolayers. *Kidney Int* 1999;55(6):2573-97.
80. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986;163(6):1433-50.
81. Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, et al. Lymphocyte infiltration in the injured brain: Role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res* 2003;72(6):726-33.
82. Espinosa E, Bermúdez-Rattoni F [Behavior-immunity relationship: the role of cytokines] *Rev Invest Clin* 2001; 53 (3): 240-253
83. Dantzer R, Konsman J.P., Bluthé R.M., Kelley K.W. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 2000; 85 (1-3): 60-65
84. Zentella A, Manogue K, Cerami A. The role of cachectin/TNF and other cytokines in sepsis. *Prog Clin Biol Res* 1991;367:9-24.
85. Blatteis CM. The afferent signalling of fever. *J Physiol* 2000;526 Pt 3:470.
86. Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (Fc gamma RIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology* 2001;102(3):331-7.
87. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isemann S, Vadas MA, Gambie JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996;157(1):360-8.
88. Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* 1984;160(1):55-74.
89. Hume DA, Underhill DM, Sweet MJ, Ozinsky AO, Liew FY, Aderem A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2001;2(1):11.
90. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* 1999;162(4):2341-6.
91. Mantovani A. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol* 1999;72:1-6.
92. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, et al. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by NF-kappaB-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cells proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 2003;2.
93. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 1995;9(10):910-8.
94. Dejana E, Del Maschio A. Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb Haemost* 1995;74(1):309-12.
95. Worrall NK, Chang K, LeJeune WS, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB, Jr., et al. TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):H2565-74.
96. Anrather D, Millan MT, Palmethofer A, Robson SC, Geczy C, Ritchie AJ, et al. Thrombin activates nuclear factor-kappaB and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol* 1997;159(11):5620-8.
97. Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL, Ortel TL, Ideill S, Ghio AJ, et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(9):1200-9.
98. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987;18(3):234-9.
99. Drouet L. Venous thromboembolic pathology. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2001;94(11 Suppl):1318-25.
100. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96(1):60-8.
101. Johns DG, Webb RC. TNF-alpha-induced endothelium-independent vasodilation: a role for phospholipase A2-dependent ceramide signaling. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):H1592-8.
102. Colwell J. Pathogenesis of vascular disease. *Diabetes* 2000;49 Suppl 2:S19-24.
103. Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, et al. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1999;343 Pt 2:335-40.
104. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190(3):244-54.
105. Zhou M, Wang P, Chaudry IH. Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1335(1-2):182-90.
106. Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl A:31-9.
107. Galley HF, Nelson SJ, Dhilon J, Dubbels AM, Webster NR. Effect of the nitric oxide inhibitor, L-N(G)-monomethylarginine, on accumulation of interleukin-6 and interleukin-8, and nuclear factor-kappaB activity in a human endothelial cell line. *Crit Care Med* 1999;27(5):908-12.
108. Stoclet JC, Martinez MC, Ohlmann P, Chasserot S, Schott C, Kleschyov AL, et al. Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* 1999;100(2):107-12.
109. Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* 2000;191(12):2131-44.
110. Tracey KJ, Mergello S, Koplin B, Fahey TJ, 3rd, Fox J, Aledo A, et al. Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominantly acute anorexia. *J Clin Invest* 1990;86(6):2014-24.
111. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17(25):3261-70.
112. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996;183(3):949-58.
113. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):R577-95.
114. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci*



- 1990;587:325-31.
115. Calvin JW. Thoracoscopy and intrathoracic extrapleural lipoma. *Chest* 1977;71(1):121.
116. Maitra SR, Wojnar MM, Lang CH. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. *Shock* 2000;13(5):379-85.
117. McCallum RE. Hepatocyte-Kupffer cell interactions in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin. *Prog Clin Biol Res* 1981;62:99-113.
118. Zentella A, Manogue K, Cerami A. Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine* 1993;5(5):436-47.
119. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Muller-Werdan U, Werdan K, et al. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock* 1999;11(5):336-41.
120. Vary TC, Hazen SA, Maish G, Cooney RN. TNF binding protein prevents hyperlactatemia and inactivation of PDH complex in skeletal muscle during sepsis. *J Surg Res* 1998;80(1):44-51.
121. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):734-9.
122. Oertli B, Beck-Schimmer B, Fan X, Wuthrich RP. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J Immunol* 1998;161(7):3431-7.
123. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229(4716):869-71.
124. Opal SM CJ. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999;27(8):1608-16.
125. Chehab MS. Can we reduce mortality in sepsis? *Saudi Med J* 2004;25(3):277-84.
126. Dhainaut JF YS, Claessens YE. Protein C/activated protein C pathway: overview of clinical trial results in severe sepsis. *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S194-201.
127. Murata A. Granulocyte Colony-stimulating Factor as the Expecting Sword for the Treatment of Severe Sepsis. *Curr Pharm Des* 2003;9(14):1115-20.
128. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Laffan JJ, Ferguson DA. Inhibiting early activation of tissue nuclear factor-kappa B and nuclear factor interleukin 6 with (1->3)-beta-D-glucan increases long-term survival in polymicrobial sepsis. *Surgery* 1999;126(1):54-65.
129. Caille V BP, Grimaldi D, Vieillard-Baro A. Physiopathology of severe sepsis. *Presse Med* 2004;33(4):256-61.
130. Janssens U GJ. Shock: What are the basics? *Internist (Berl)* 2004;45(3):258-66.
131. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med* 2003;138(6):502-5.
132. Opal SM, Cross AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13(2):285-97, vii.

## La regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio

Lucia Nikolaia López-Bojorquez\*

\* Departamento de Biología Celular • Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, D.F.

Los factores de transcripción son proteínas muy especializadas que reconocen secuencias específicas de DNA en la región reguladora de todos los genes. La unión de estos factores a esta región promotora regula, positiva o negativamente, la expresión y la subsecuente producción de la proteína codificada por el gene en cuestión. Hay muchos distintos tipos de factores transcripcionales, pero pueden dividirse entre constitutivos e inducibles. En términos generales los constitutivos son aquellos que regulan la expresión basal de los genes que codifican para todas las proteínas estructurales o de mantenimiento, es decir, las enzimas y los componentes proteicos presentes en todas las células y que son fundamentales para la función celular en general. Los factores de transcripción inducibles son aquellos que regulan la expresión de genes que solamente se utilizan en ciertos tipos celulares o en ciertos momentos de la vida de la célula. Recordemos que en una célula somática diferenciada se encuentra presente toda la información genética necesaria para formarse cualquier otro tipo celular. Esto quiere decir que en cada célula debe existir un programa de regulación de la expresión génica que se adapte a sus funciones particulares y su entorno.<sup>1</sup> Los factores de transcripción forman parte importante de este programa.

Hace casi veinte años fue descrito NF- $\kappa$ B como un factor nuclear capaz de unirse al enhancer  $\kappa$  (región reguladora) del promotor de la cadena pesada de los genes que codifican para inmunoglobulinas.<sup>2</sup> En un principio se creyó que este factor transcripcional era exclusivo de linfocitos B por haberse encontrado en el núcleo de este tipo celular. Sin embargo, ahora se sabe que se expresa de manera constitutiva en prác-

ticamente las células del sistema inmune. A diferencia de otros factores de transcripción, que generalmente se encuentran en el núcleo, NF- $\kappa$ B se localiza de manera basal en el citoplasma en un estado inactivo y necesita un estímulo específico para traslocarse al compartimiento nuclear. Sólo en las células B y sus progenitoras se encuentra NF- $\kappa$ B constitutivamente en el núcleo.

El panorama actual muestra que este factor regula la transcripción de una gran variedad de genes, en particular aquellos involucrados en la respuesta inmune y control de la proliferación celular. NF- $\kappa$ B es un **homo o heterodímero** constituido por diferentes subunidades que han sido agrupadas dentro de la **familia Rel**.

### LA FAMILIA REL

En esta familia de proteínas se agrupan genes que están altamente conservados a lo largo de la evolución de organismos multicelulares. En la mosca de la fruta *Drosophila*, se han descrito varias moléculas de la familia NF- $\kappa$ B: *relish*, *dorsal* y *dif* involucradas en la inmunomodulación. En mamíferos se han descrito las subunidades RelB, c-Rel, p65, p50 y p52. También se han encontrado homólogos en plantas e incluso en levaduras.<sup>3</sup>

NF- $\kappa$ B funciona como un homo o heterodímero de miembros de la familia Rel. Cada proteína Rel tiene una región conservada de 300 aa en el N-terminal llamado dominio Rel (Figura 1) que es la responsable de la dimerización, la unión a DNA, y la interacción con las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B.<sup>4</sup> El dímero más abundante y el primero que fue descrito es el

formado por las subunidades p50 y p65. Es importante resaltar la existencia de diferentes subunidades de la familia Rel y el hecho de que éstos pueden formar heterodímeros tiene consecuencias fisiológicas importantes, ya que cada combinación de díme-

ros tiene distinto potencial transcripcional. Esto quiere decir que algunas combinaciones resultan en factores de transcripción más activos que otros o bien que se utilizan en distintos momentos de la respuesta inmune. Las combinaciones más comunes y con mayor actividad son p50:p65, p50:c-Rel, p50:p50 y p65:c-Rel.<sup>5</sup> La secuencia consenso de DNA a la que se unen todos los dímeros es 5' **GGGRNYYCC** 3' (Donde N indica A, C o T; R es una purina y Y una pirimidina).<sup>6</sup> Los distintos dímeros tienen diferente especificidad por la secuencia consenso.<sup>7</sup> Toda esta complejidad quiere decir que en realidad cuando nos referimos al factor NF-κB en realidad se incluye a una familia de heterodímeros que producen efectos transcripcionales diferentes entre sí. Desentrañar esta complejidad es uno de los grandes interrogantes sobre esta familia de factores de transcripción y sobre la regulación molecular del sistema inmune en general.

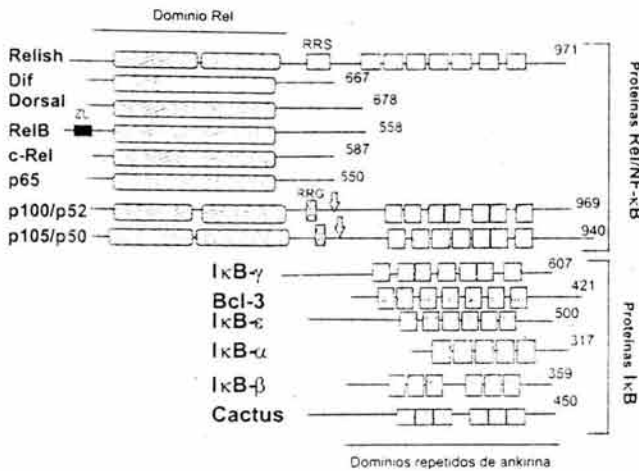


Figura 1. Estructura de los miembros de la familia Rel/NF-κB. Se encuentran alineados a partir del dominio Rel: Se muestran también las proteínas inhibitoras IκB. Las flechas verticales indican los sitios donde ocurre el rompimiento proteolítico de p105 y p100. RRG- región rica en glicinas. RRS- región rica en serinas. LZ- región de zipper de leucina. Se indica el número de aa en el que termina la secuencia proteica.

### ¿Cómo se trasloca al núcleo NF-κB?

El factor NF-κB es secuestrado en el citoplasma de la célula como un precursor inactivo que forma un complejo con la proteína inhibitora IκB. La retención de NF-κB en el compartimiento citoplásmico y su eventual traslocación al núcleo es el resultado del ocultamiento o exposición de ciertas secuencias

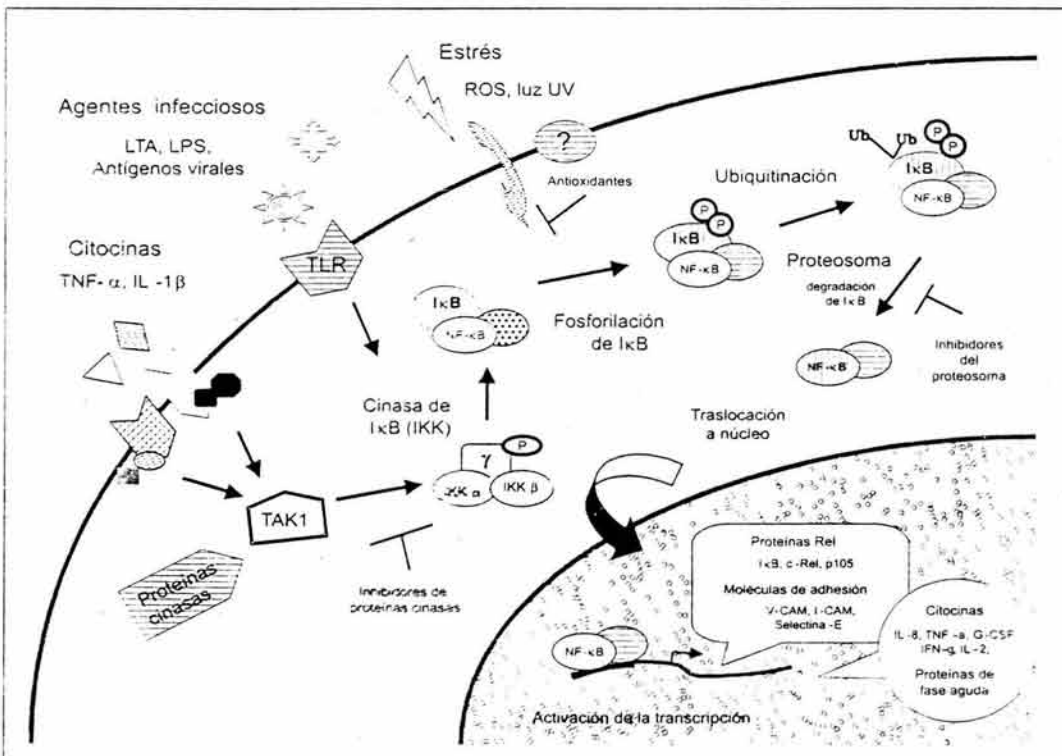


Figura 2. Regulación de NF-κB. La activación del factor está mediada por múltiples pasos. El factor permanece en el citoplasma hasta que es liberado de la proteína inhibitora IκB. Distintos estímulos participan en su activación. Una vez en el núcleo puede transcribir genes relacionados con la respuesta inflamatoria, la defensa a estrés y la modulación de la respuesta inmune.

de aminoácidos denominados péptidos señal que determinan el destino nuclear de las proteínas que los presentan. La interacción con I $\kappa$ B oculta una de las dos secuencias que determinan el destino nuclear de NF- $\kappa$ B. Al estar en contacto con I $\kappa$ B no puede ser reconocido por la maquinaria molecular que transporta (trasloca) proteínas hacia el núcleo. Los pasos necesarios para la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo incluyen: fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma de la proteína inhibidora I $\kappa$ B para permitir entonces la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Figura 2). Una vez en el núcleo, el factor se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes blanco y activa la transcripción.

### ¿Qué estímulos activan a NF- $\kappa$ B?

En prácticamente todos los organismos en los que ha sido caracterizado, NF- $\kappa$ B participa principalmente en la modulación de la respuesta inmune a distintos niveles. En *Drosophila*, por ejemplo, se ha encontrado que transcribe genes con actividad bactericida o fungicida.<sup>8</sup> En mamíferos tiene participación importante en la inflamación, la respuesta a estrés, la diferenciación y activación de células inmunes. La variedad de señales que pueden activar NF- $\kappa$ B es reflejo de la cantidad de eventos con que ha sido relacionado. Los mejor caracterizados son aquellos que involucran citocinas inflamatorias como Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los estímulos mitogénicos como ésteres de forbol (PMA), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS, un constituyente de la membrana externa de bacterias gramnegativas) y expresión de antígenos virales. Se ha descrito que también puede ser activado por eventos relacionados con daño celular como radiación ultravioleta (UV) o estrés oxidativo,<sup>9</sup> exposición a metales<sup>10</sup> y fenómenos particulares como el aumento de los niveles citoplásmicos de calcio. La activación de NF- $\kappa$ B es sensible en muchos casos al estado redox o a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, por lo tanto puede ser regulado por el estado de oxidorreducción general de la célula.<sup>11</sup>

### La transducción de las señales que activan a NF- $\kappa$ B

Las citocinas son hormonas peptídicas involucradas en distintos aspectos de la regulación del sistema inmune. Modulan diferenciación, activación, muerte y proliferación celular entre una gran variedad de eventos. Se unen a receptores muy específicos expues-

tos en la superficie de la célula blanco que generalmente presentan muy alta afinidad por la citocina ligando. A partir de este momento, la señal es llevada al núcleo celular mediante una cadena de proteínas cinasas (que catalizan la unión de fosfatos en otra proteínas) y que en su conjunto forman una cascada de señalización que termina generalmente en la activación de uno o varios factores de transcripción y la subsecuente expresión de genes.

En el caso de la activación de NF- $\kappa$ B mediada por IL-1- $\beta$  y TNF- $\alpha$  la unión del ligando a sus receptores membranales, denominados IL-1R y TNFR1, respectivamente, activan una cascada de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, tras la unión de TNF- $\alpha$  a su receptor, distintas proteínas acopladoras (como TRADD, RIP, TRAF2) a este complejo puede asociarse también a la proteína cinasa NIK. A nivel de la proteína cinasa TRAF2 ocurre una bifurcación de la vía y pueden activarse otras cascadas de transducción a través de las proteínas JNK/SAPK (Cuadro 1). La cinasa NIK (por sus siglas en inglés, *NF- $\kappa$ B inducible kinase*)<sup>12</sup> es el primer componente de la vía inducida por TNF $\alpha$  que está encaminada exclusivamente a la activación de NF- $\kappa$ B.

La vía activada por IL-1- $\beta$  tiene muchos puntos en común con la de TNF- $\alpha$ . La unión de IL-1 $\beta$  media la agregación de su receptor con distintas proteínas acopladoras accesorias (IL-1R, IL-1RacP, IRAK, TRAF6).<sup>13</sup>

También estímulos infecciosos como LPS, inducen la activación de NF- $\kappa$ B. De hecho la activación del sistema de monocitos macrófagos depende del reconocimiento de estas células a antígenos específicos. El LPS activa a los macrófagos a través de una vía que culmina en la traslocación de NF- $\kappa$ B. Prácticamente todos los productos proinflamatorios que los macrófagos secretan son regulados por este factor. De hecho, no sólo las bacterias gramnegativas y, por lo tanto, no sólo el LPS activan macrófagos.<sup>14</sup>

La presencia de otros antígenos bacterianos como peptidoglicanos solubles ( $\alpha$ -PGN) o ácido lipoteicoico (LTA) también inducen la traslocación de NF- $\kappa$ B a través del receptor membranal TLR2.<sup>15</sup> Este receptor y por lo tanto el factor de transcripción están involucrados en el reconocimiento del sistema mieloide a lipoproteínas y glicolípidos presentes en mycoplasmas, y bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Media la respuesta a lipoproteínas derivadas de organismos como *M. tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Trepomena pallidum* y *Mycoplasma fermentans* 16 y de lipopolisacáridos derivados del patógeno *Leptospira interrogans*.<sup>17</sup> En cultivos celulares de macrófagos es el responsable de la respuesta



**Cuadro 1.** Proteínas que se mencionan en el texto.

Abreviatura	Nombre completo	Características
TRADD	Proteína que se asocia al dominio de muerte de TNFR1	Proteína acopladora de TNFR1 que participa en el reclutamiento de RIP y TRAF2
TRAF2	Factor 2 asociado a TNFR1	Proteína adaptadora de la señal de TNF- $\alpha$
RIP	Proteína que interactúa con receptor	Proteína con dominio de muerte y actividad de cinasa
IL-1RAcP	Proteína accesoria de IL-1R	Estabiliza el complejo IL-1R
IRAK	Proteína cinasa asociada IL-1R	Proteína acopladora de IL-1R que participa en el reclutamiento de TRAF6
TRAF6	Factor 6 asociado a TNFR1	Proteína adaptadora de la señal de IL-1
Vía MAPK	Sistema de las proteínas cinasas activadas por mitógenos	Compuesta de las cinasas MAPKKK, MAPKK, MAPK y MAP.
JNK	Proteína cinasa del amino terminal de c-jun	Participa en la vía de las JNK cinasas, JNKK
SAPK	Proteína cinasa activada por estrés	Parte de la familia de las JNK cinasa
CHUK	Cinasa con dominio hélice-vuelta-hélice	Cinasa de residuos de serina y treonina ahora llamada IKK1
PP2A	Fosfatasa 2A	Fosfatasa multimérica, de serinas y treoninas
PKR	Cinasa activada por RNA de doble cadena	Media la acción antiviral de IFN- $\gamma$
TAKA	Cinasa activada por Tqf- $\beta$	
I-CAM	Molécula de adhesión intercelular	Se une a la molécula de superficie LFA-1
V-CAM	Molécula de adhesión vascular	Se une a la molécula de superficie BLA-1
Selectina-E	Molécula de adhesión	Participa en los eventos tempranos de adhesión
NOS	Sintasa de óxido nítrico	Se expresa en células endoteliales
NIK	Proteína cinasa que induce NF- $\kappa$ B	Cinasa que fosforila a IKK

por bacterias en suspensión (*S. aureus* y *B. subtilis*).

La participación de NF- $\kappa$ B resulta entonces fundamental para la expresión de genes que responden a estímulos infecciosos. Prácticamente todos los miembros de la familia de receptores Toll like (TLR) que reconocen una gran variedad de antígenos infecciosos, convergen en algún momento en la traslocación de NF- $\kappa$ B. El LPS se une específicamente a su receptor TLR4, induciendo con esto NF- $\kappa$ B y activación mieloide. La activación del sistema de monocitos/macrófagos ocurre por moléculas como proteoglicanos, zimosan lipoproteínas, taxol, ácido lipoeitoico, todos ellos antígenos bacterianos que se unen a distintos miembros de la familia de receptores TLR.<sup>15,16,15</sup>

Por otro lado, el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induce traslocación de NF- $\kappa$ B por ejemplo, y el tratamiento con agentes antioxidantes puede bloquear la fosforilación de I $\kappa$ B. La vía (o las vías de señales) que controla estos mecanismos no está caracterizada hasta el momento. NF- $\kappa$ B parece prácticamente el único factor de transcripción en mamíferos que puede responder al estado redox de la célula.<sup>6</sup>

La variedad de estímulos que activan NF- $\kappa$ B sugiere que muchas vías de transducción están involucradas en su traslocación, sin embargo, no queda claro si todas ellas convergen en un intermediario común o si la fosforilación de I $\kappa$ B puede proceder de

distintos estímulos.<sup>19</sup> Lo que es claro es que la fosforilación de I $\kappa$ B es el evento que dispara la traslocación y por tanto la regulación de la proteína cinasa que fosforila I $\kappa$ B es actualmente el centro de atención en la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>20</sup> Por ejemplo, dos estímulos distintos que activan NF- $\kappa$ B, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  activan vías de transducción que convergen en la cinasa TAK1.<sup>21</sup> Esta cinasa directamente regula a la cinasa de I $\kappa$ B, entonces ¿qué distingue un estímulo del otro?, ¿son diferentes las formas de NF- $\kappa$ B activadas?, ¿por qué las respuestas celulares a IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  son similares, pero no idénticos? Seguramente cada tipo celular tiene una organización distinta de la vía de transducción de señales que regulan en casos específicos la activación del factor.

El hecho de que existan distintos homo o heterodímeros cada uno con un potencial transactivador particular y que sea tal la variedad de vías de transducción de señales que pueden inducir la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B puede sugerir que para cada tipo de estímulo corresponde una combinación particular de isoformas de NF- $\kappa$ B.

### Lo que nos dice el uso *in vitro* de fármacos inhibidores

Las primeras evidencias que se tuvieron acerca de la regulación de NF- $\kappa$ B provienen del uso *in vitro* de



agentes inhibidores que interfieren en alguno de los distintos eventos necesarios para la traslocación del factor. La regulación de la activación de NF- $\kappa$ B es un fenómeno cuya complejidad queda revelada al poder bloquear de manera diferencial eventos tan distintos como fosforilación, degradación de proteínas, estrés oxidativo o transducción de señales<sup>22</sup> utilizando fármacos específicos.

La degradación de I $\kappa$ B ocurre en los complejos proteicos multicatalíticos dependientes de ATP que forman parte de una estructura celular denominada proteosoma y que se encarga de degradar las proteínas celulares de manera regulada. El uso de inhibidores del proteosoma como calpaína, PSI o MG-123 o de inhibidores de proteasas como TPCK y TLCK, inhibe la degradación de I $\kappa$ B y permite la acumulación en el citoplasma de su estado fosforilado.<sup>23,24</sup>

Con la utilización de agentes reductores como salicilatos, PDTC y agentes alquilantes,<sup>25</sup> puede bloquearse *in vitro* la fosforilación de I $\kappa$ B. Además, la sobreexpresión de la enzima glutatión peroxidasa (una enzima antioxidante) tiene un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de I $\kappa$ B y la subsecuente activación de NF- $\kappa$ B<sup>26</sup>. Sin embargo, la sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que aumenta la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es capaz de potenciar la activación de NF- $\kappa$ B.

Entre los fármacos que pueden inhibir la activación de NF- $\kappa$ B (por distintos mecanismos) están los antiinflamatorios e inmunosupresores como los glucocorticoides, que en algunos tipos celulares pueden inhibir la transcripción de I $\kappa$ B. La ciclosporina A y la rapamicina, ambos inmunosupresores, inhiben la activación de NF- $\kappa$ B en células T. También drogas que han sido ensayadas por su actividad antitumoral como la daunorrubicina, pueden activar NF- $\kappa$ B.

### ¿Cuál es la enzima que fosforila a I $\kappa$ B?

Se sabe que pese a ser la señal inicial, la fosforilación de I $\kappa$ B no es suficiente para la traslocación de NF- $\kappa$ B, sino el marcador para su posterior degradación.<sup>27,28</sup>

La identificación de la cinasa responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B resultó un problema durante mucho tiempo. Nunca se pudo obtener por mutagénesis en *Drosophila*, donde se han aislado muchos de los homólogos de la vía de transducción de señales de IL-1, incluyendo las proteínas *dorsal* y *cactus* (homólogos de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B). Posiblemente esto refleja que la falta de la cinasa de I $\kappa$ B resulta letal para el organismo.<sup>29</sup>

Analizando mutantes de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B en las que artificialmente se habían cambiado

distintos aminoácidos (mutagénesis dirigida), pudieron identificarse los residuos serina 32 y serina 36 (S32 y S36) como los aceptores de la fosforilación que sirve como señal de degradación. Los análisis bioquímicos de mutaciones puntuales sobre I $\kappa$ B demostraron muy pronto que la cinasa en cuestión debía ser específica para residuos de serina, ya que la sustitución por otros aminoácidos como alaninas o por treoninas disminuía notablemente su degradación.<sup>30</sup>

Otra proteína miembro de la familia I $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$  es fosforilada en los sitios homólogos de ser19 y ser23, y de hecho todas las proteínas I $\kappa$ B, incluyendo a *cactus* de *Drosophila* son fosforiladas residuos de serina localizados en regiones homólogas del C-terminal y en la misma secuencia consenso DSGXXS.<sup>30</sup>

La identificación de la cinasa responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B comenzó a seguir un camino concreto, cuando a partir de células HeLa se purificó un complejo multiproteico con un peso molecular de aproximadamente 700 kDa que específicamente fosforila a I $\kappa$ B- $\alpha$  en los residuos S32 y S36. ADDIN ENRfu.<sup>31</sup> A partir de purificaciones bioquímicas de este complejo, se identificaron los dos polipéptidos que específicamente fosforilan I $\kappa$ B en los residuos S32 y S36 con pesos moleculares de 87 y 85 kDa. El gene que codifica para el polipéptido de 85 kDa fue secuenciado con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada y fue identificado como una cinasa clonada previamente llamada CHUK. Tras comparar la secuencia de DNA de los genes que codifican para ambos polipéptidos se encontró que ambos comparten similitud de 52%, e interactúan con las otras proteínas del complejo de un dominio de zipper de leucina. A este complejo multiproteico se le llamó IKK (por I $\kappa$ B Kinase) y a los polipéptidos con pesos de 85 y 87 kDa, respectivamente, se les llamó IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ . Casi al mismo tiempo, pero utilizando el sistema de dobles híbridos en levadura se identificó el polipéptido p85 (IKK $\alpha$ ) asociado a la cinasa NIK, corroborando que ésta era la cinasa de I $\kappa$ B.

Recientemente se ha sugerido que la regulación fina de las distintas señales que convergen en la vía de NF- $\kappa$ B se encuentra al nivel de este complejo multiproteico responsable de la fosforilación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B. Este complejo está compuesto entonces por dos subunidades catalíticas, las proteínas cinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ . Se ha identificado a la proteína IKK $\alpha$  como una subunidad regulatoria del complejo, y a la proteína E3 ligasa como parte del aparato que permitirá el reconocimiento de I $\kappa$ B en el proteosoma donde será finalmente degradada. Algu-

nos autores han denominado este complejo como sig-nalósoma de IKK.<sup>32</sup>

Actualmente la cinasa IKK ha sido estudiada *in extenso*, sin embargo, su participación particular en eventos patológicos no se conoce del todo.

### La regulación de IκB

La familia Rel incluye también las proteínas inhibidoras que secuestran en el citoplasma a NF-κB (las proteínas inhibidoras IκB). De éstas se han descrito al menos seis miembros: IκB-α IκB-β IκB-ε IκB-γ, Bcl-3 y *cactus de Drosophila*. Todas ellas siguen básicamente la misma vía de fosforilación-ubiquitinación-degradación. Todas también presentan dominios conservados de ankirina que son regiones que sirven para mediar interacciones proteína-proteína, el C-terminal donde se fosforilan para ser degradadas (léase ser 32 y 36) y el dominio PEST en el N-terminal, en donde ocurre la fosforilación que regula el recambio y la homeostasis de esta proteína. Diferentes isoformas de IκB secuestran distintos heterodímeros de NF-κB, por ejemplo, IκB-α e IκB-β interactúan preferencialmente con p50:p65 y p50:c-Rel mientras que IκB-ε captura a p65 y c-Rel homo y heterodímero, por su parte Bcl-3 secuestra los homodímeros p50 y p52.<sup>33</sup> Se ha propuesto que para las distintas isoformas de IκB existen distintas formas de regulación, pero la cuestión no es muy clara hasta el momento. Las más estudiadas son IκB-α e IκB-β, ambas se fosforilan en residuos de serina en posiciones homólogas sin que sea claro si son sustrato de distintas cinasas. Se han encontrado diferencias en las cinéticas de degradación de ambas proteínas en células sometidas a distintos estímulos; una clase de inductores (entre ellos el TNF-α) afectan de manera transitoria a IκB-α, mientras que otro tipo de estímulos (como IL-β) induce una activación más prolongada de IκB-α e IκB-β. La cinética de la degradación de IκB-α parece ser más rápida que la de IκB-β.<sup>34</sup>

### La ubiquitinación y degradación

La vía proteolítica que involucra la ubiquitinación y degradación proteolítica por el proteosoma ha sido caracterizada como parte de los mecanismos celulares para degradar selectivamente moléculas proteicas. Algunos factores de transcripción, receptores y moléculas de superficie y otras entidades proteicas que tienen un ciclo de vida controlado o que deben desaparecer en momentos particulares de la vida de

la célula. Tal es el caso de IκB que debe ser degradado para permitir la traslocación de NF-κB al núcleo. Estas degradaciones específicas involucran dos pasos: la señalización o marcaje de la molécula a degradar mediante unión covalente de moléculas de ubiquitina y la degradación de las proteínas que lleva a la liberación y reutilización de la ubiquitina. Esta vía involucra las enzimas conjugadoras de ubiquitina E2, E1 y E3 y la degradación por parte de complejos multicatalíticos dependientes de ATP en el proteosoma, donde distintas enzimas como la proteasa S20 y la proteasa S26 degradan proteínas marcadas específicamente.<sup>35</sup>

En IκB, como en la mayoría de las proteínas destinadas a ser degradadas, la ubiquitinación ocurre en residuos de lisina, que en el caso de IκB-α ocurre en las lisinas 21, 22 y 23.<sup>36</sup> Por mutagénesis dirigida se ha encontrado que la falta de estos dominios interfiere con la degradación de IκB, mas no con su fosforilación. Debido a que la degradación de IκB ocurre antes de su disociación de NF-κB, la señal de ubiquitinación permite una degradación específica por parte del proteosoma. Estos experimentos demostraron que si bien la fosforilación es un paso necesario en la activación de NF-κB la traslocación al núcleo no ocurre sino hasta después de que IκB es degradado.

### Los fenómenos regulados por NF-κB

Los genes activados por NF-κB incluyen los que codifican los mismos factores responsables de su activación, es decir, que activa la transcripción de los genes que codifican para citocinas como IL-1β y TNF-α. También participa en la producción de otras citocinas inflamatorias como interferón gama (IFN-γ), IL-6 y algunas como linfotóxina, IL-2, e IL-8. NF-κB también activa la transcripción de moléculas de adhesión como I-CAM, Selectina-E, V-CAM y participa en su propia regulación al inducir los genes de proteínas de la familia Rel como c-Rel y p105. La secuencia de DNA a la que se une el factor NF-κB (sitio κB) se encuentra en el promotor de genes involucrados en inflamación y actividad cardiovascular como la sintasa de óxido nítrico (NOS) el angiotensinógeno y el receptor a tromboxanos.

NF-κB participa de manera importante en el desarrollo del sistema inmune, aunque los resultados obtenidos con ratones deficientes (*knockouts* modificados genéticamente) no dejan claro el mecanismo exacto. Por ejemplo, la falta de p65 provoca muerte en el día 16 de gestación. en cambio el *knockout* de p50 permiten un desarrollo normal salvo por el hecho

de que las células B de estos animales no pueden responder a estímulos mitogénicos o a LPS. El *knockout* de RelB ocasiona muerte por inflamación de múltiples órganos. También se han hecho estos estudios con las proteínas inhibitoras donde el de efectos más dramáticos parece ser el de la falta de IκB-α que ocasiona atrofia de timo, bazo y defectos en la piel.<sup>5</sup>

La variedad de genes y de eventos celulares que son regulados por NF-κB sugiere que la regulación de su estado activado debe incluir distintos niveles, seguramente la presencia por sí sola de un sitio κB en el promotor de un gene no determina su actividad transcripcional, sino que debe interactuar con otros factores de transcripción.

### ¿Qué efecto tienen los genes que regula NF-κB sobre su propia actividad?

NF-κB es una proteína encargada de regular la transcripción de distintos genes que están involucrados a su vez en una gran variedad de procesos. Su regulación se encuentra bajo estricto control. Por un lado la proteína que directamente lo inhibe manteniéndolo en el citoplasma (IκB), esté regulada transcripcionalmente por NF-κB.<sup>21</sup> Además, una vez en el núcleo, NF-κB se degrada rápidamente de manera que la activación de NF-κB tiene un pico de actividad muy corto (alrededor de 30 minutos). En algunas células se ha observado un segundo pico que se cree tiene que ver con la degradación de otra isoforma de IκB.

Muchos de los genes que activa NF-κB tienen un efecto regulatorio sobre sí mismos (en algunos casos este efecto se traduce en una amplificación de la señal) por ejemplo, los genes de TNF-α, IL-1, del receptor de IL-2 son activados por NF-κB. También los genes de otros factores de transcripción tienen en sus promotores sitios κB.

Posiblemente relacionado con el hecho de que algunos de los eventos que regula NF-κB tengan carácter transitorio, es que muchos de los genes que transcribe sean miembros de la familia Rel (p105, c-Rel, IκB). Donde estas proteínas pueden tener efectos antagónicos entre sí, es decir, inducir la transcripción de IκB bloquea la actividad de NF-κB mientras que inducir la transcripción de c-Rel puede tener un efecto sinérgico sobre ésta.<sup>5</sup> Todos estos mecanismos aseguran que las señales de amplificación tendrían un efecto local o un tiempo de acción más bien corto.

### De p100 y p105

Cuando se clonó el gene que codifica para la subunidad p50, se encontró que codificaba para una pro-

teína mucho más grande, de 105 kDa, donde el extremo N-terminal era idéntico a p50. El C-terminal de esta molécula reveló que contenía los dominios de ankirina repetidos, iguales a los encontrados en la proteína IκB. Después se demostró que p50 y p52 proveían de la degradación postranscripcional de p105 y p100, respectivamente, realizada en el C-terminal, y que esta degradación ocurría de manera muy similar a la degradación de IκB: requiere fosforilación, ubiquitinación y degradación proteosomal.<sup>36</sup> Esto puede entenderse más fácilmente si se observa la figura 1, en la que se muestra la estructura de p100 y de 105 indicando el dominio Rel, en el que se encuentra la parte de la proteína que funciona como factor de transcripción y dentro de la misma molécula, las secuencias de ankirina, que se encargan de ocultar el dominio Rel para que la proteína permanezca dentro del citoplasma, es decir, factor e inhibidor como parte de la misma molécula. De manera que para traslocar al núcleo a NF-κB puede degradarse IκB o el C-terminal de p105 y de p100. Es curioso que este último mecanismo sea el que conservan las subunidades con actividad transcripcional negativa. Sin embargo, p50 también puede generarse por proteólisis de p100 independiente de estímulo, manteniendo así la población de dímeros de p50 con actividad transcripcional positiva.<sup>5</sup>

### EL PAPEL CLAVE DE NF-κB EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS E INFLAMATORIAS

La vía de activación de NF-κB por estímulos inflamatorios se ha caracterizado en detalle. La lista de enfermedades inflamatorias en las que ha sido involucrado es larga: artritis reumatoide, arteriosclerosis, esclerosis múltiple, asma, gastritis asociada a *Helicobacter pylori*, polirradiculoneuritis desmielinizante, choque séptico, etc.

En los últimos años se ha estudiado mucho la relación de este factor con una gran cantidad de estados patológicos, muchos de ellos desórdenes inmunes, como artritis reumatoide, cáncer, asma, arteriosclerosis, infección de VIH.<sup>37,38</sup> Una gran variedad de genes involucrados en adhesión celular, diapédesis, trombosis, activados por NF-κB han sido caracterizados.

Por ejemplo, *in vivo* se ha demostrado que NF-κB induce la expresión de moléculas de adhesión como Selectina-E, I-CAM, V-CAM y que la inhibición de estos genes reduce la migración de linfocitos y la trans migración celular. La unión primaria de las bacterias a los epitelios cercanos al sitio de infección se ve faci-



litada por la expresión de ICAM-1 mediada por NF- $\kappa$ B. La expresión de los genes que codifican para moléculas de superficie en las células endoteliales, en particular moléculas de adhesión resulta de vital importancia para el reclutamiento de células del sistema inmune durante el proceso de inflamación, sin embargo cuando este proceso ocurre a nivel sistémico, es decir, cuando ocurre en grandes porciones de la red vascular, comienza una serie de alteraciones en el flujo sanguíneo que conllevan entrada masiva de líquido y de células en los tejidos.<sup>39</sup> En el epitelio alveolar expuesto a agentes irritantes se expresan moléculas de adhesión como ICAM-1,<sup>40,41</sup> donde NF- $\kappa$ B y el factor de transcripción AP-1 participan. También en la expresión de la glicoproteína factor tisular (TF) en células de hígado, pulmón e intestino delgado, donde el inicio de cascada de coagulación contribuye a la patofisiología del trauma severo.

Durante eventos infecciosos los epitelios producen también quimiocinas, quimioattractores celulares que facilitan la infiltración celular. La producción de estas quimiocinas (como MIP-1, IL-8, Rantes) también está regulada por NF- $\kappa$ B.<sup>42</sup>

También participa en la expresión de proteínas de fase aguda que se secretan en el hígado en respuesta a IL-6 producido por las células de Kupffer. Esta bacteria de proteínas circulantes producidas por hepatocitos tiene como consecuencia niveles elevados en sangre de fibrinógeno además de amiloide sérico A,  $\beta$ -fibrinógeno, metalotioneína-1,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina,  $\alpha$ -2-macroglobulina, haptoglobina, hemopexina y otras proteínas involucradas en el transporte, la coagulación y la remodelación tisular.<sup>43</sup>

Juega también un papel importante en la desregulación del tono vascular e hipotensión que se observa durante el choque séptico, fundamentalmente a partir de la expresión de dos enzimas: la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la ciclooxigenasa 2 (Cox-2). La primera cataliza la formación de óxido nítrico, un potente agente vasodilatador que difunde del endotelio a la capa de músculo liso de toda la vasculatura. La segunda participa en la producción de prostaglandina 2-E. La enzima NOS endotelial se expresa en respuesta a la activación de NF- $\kappa$ B que ocurre por citocinas inflamatorias. Se sabe que el gene Cox-2 presenta en su región reguladora dos regiones de unión para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y puede ser inhibida por agentes antioxidantes.<sup>44</sup> Muy poco se conoce acerca del mecanismo de acción de la prostaglandina 2E como agente vasodilatador. Los inhibidores de la Cox-2 y de la NOS que bloquean la vía de transducción de NF- $\kappa$ B, incrementan la respuesta contráctil en pacientes con choque

séptico, y los estudios *in vitro* sugieren que la sobreproducción de prostanoideos contribuye a contrarrestar la reactividad de agentes vasoconstrictores como norepinefrina.<sup>45</sup>

En los últimos años ha crecido el campo de la exploración de fármacos antiinflamatorios cuyo blanco de acción resulta algún componente de la vía I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B.

Así, la importancia de NF- $\kappa$ B como blanco terapéutico ha cobrado suma importancia con el advenimiento de nuevas drogas antiinflamatorias no esteroideas, muchas de las cuales hacen blanco directo en la actividad de dicho factor.<sup>46</sup> Específicamente sustancias como sulfazalazina, ácido acetilsalicílico, leflumonida, etc. son capaces de inhibir la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B tanto *in vivo*, como *in vitro*. Aunque muchas de estas drogas son específicas, requieren niveles relativamente altos para arrojar resultados *in vivo*, por lo tanto, resultan un campo importante de experimentación.<sup>47</sup>

Como parte de las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del choque séptico también se han utilizado fármacos inhibidores de la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>47,48</sup> En este caso, la secuencia de tratamientos recomendada clínicamente consiste en aplicar en el siguiente orden, agentes antibióticos y estimuladores del sistema inmune, inhibidores de LPS, inhibidores de la coagulación, antioxidantes, antagonistas de citocinas y citocinas antiinflamatorias, muchos de ellos involucrados con la vía de activación de NF- $\kappa$ B a distintos niveles. En ocasiones el efecto combinado de todos estos agentes puede aumentar las oportunidades de sobrevivencia.<sup>49</sup>

En suma, la activación de grupos específicos de genes en respuesta a inductores dados comienza con la activación de una o más vías de transducción de señales que convergen en la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B permitiendo su degradación y la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo.<sup>36</sup> El gene blanco es seleccionado por las secuencias  $\kappa$ B presentes en su región reguladora y la presencia de otros factores de transcripción permiten entonces a NF- $\kappa$ B activar la transcripción genética. Una variedad de detalles están presentes en la regulación de cada uno de estos pasos y de su comprensión puede devenir un mejor entendimiento del sistema inmune y su regulación.

#### REFERENCIAS

1. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; 10(7): 739-25.
2. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6): 921-8.

3. Friedrich L, et al. NIMI overexpression in arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; 14(9): 1114-24.
4. Muller CW, et al. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 1995; 373(6512): 311-7.
5. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60.
6. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-83.
7. Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12(10): 4412-21.
8. Gonzalez-Crespo S, Levine M. Related target enhancers for dorsal and NF-kappa B signaling pathways. *Science* 1994; 264(5156): 255-8.
9. Schmidt KN, et al. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 1995; 2(1): 13-22.
10. Goebeler M, et al. Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J Immunol* 1995; 155(5): 2459-67.
11. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999; 13(10): 1137-43.
12. Cao Y, et al. IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 2001; 107(6): 763-75.
13. Woroniec JD, et al. I kappa B kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with I kappa B kinase-alpha and NIK. *Science* 1997; 278(5339): 866-9.
14. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001; 107(1): 13-9.
15. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol* 2003; 170(7): 3451-4.
16. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(4): 625-35.
17. Werts C, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2(4): 346-52.
18. Guha M, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98(5): 1429-39.
19. de Martin R, et al. Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B. *Embo J* 1993; 12(7): 2773-9.
20. Verma IM, Stevenson J. I kappa B kinase: beginning, not the end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(22): 11758-60.
21. Dixit V, Mak TW. NF-kappaB signaling. Many roads lead to Madrid. *Cell* 2002; 111(5): 615-9.
22. Kretz-Remy C, et al. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 1996; 133(5): 1083-93.
23. Finco TS, Beg AA, Baldwin AS Jr. Inducible phosphorylation of I kappa B alpha is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(25): 11884-8.
24. Miyamoto S, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(26): 12740-4.
25. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80(4): 529-32.
26. Toledano MB, et al. N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF-kappa B p50 and p65. *Mol Cell Biol* 1993; 13(2): 852-60.
27. Traenkle EB, et al. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 1995; 14(12): 2876-83.
28. Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(7): 3792-7.
29. Kopp EB, Ghosh S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995; 58: 1-27.
30. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87(1): 13-20.
31. DiDonato JA, et al. A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997; 388(6642): 548-54.
32. Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2): 226-32.
33. Karin M. The beginning of the end: I kappa B kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1999; 274(39): 27339-42.
34. Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* (Augusta, Ga.) 2002; 18(2): 99-106.
35. Ciechanover A, et al. The ubiquitin-mediated proteolytic system: involvement of molecular chaperones, degradation of oncoproteins, and activation of transcriptional regulators. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995; 60: p. 491-501.
36. Orian A, et al. Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol* 1999; 19(5): 3664-72.
37. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107(2): 135-42.
38. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107(1): 3-6.
39. McCaffree DR, et al. Role of pulmonary edema in the acute pulmonary response to sepsis. *J Appl Physiol* 1981; 50(6): 1198-205.
40. Parikh AA, et al. IL-1beta induction of NF-kappaB activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling. *Shock* 2000; 13(1): 8-13.
41. Armstead WM. Role of endothelin-1 in age-dependent cerebrovascular hypotensive responses after brain injury. *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 2): H1884-94.
42. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107(1): 7-11.
43. Derfalvi B, et al. Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro. *Cell Biol Int* 2000; 24(2): 109-14.
44. Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 1999; 100(12): 1330-7.
45. Taddei S, et al. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation* 1999; 100(13): 1400-5.
46. Riedemann NC, Guo RF, Wang PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2002; 9(5): 517-24.
47. Sharma VK, Dellinger RP. Recent developments in the treatment of sepsis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12(2): 139-52.



48. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2): 138-50.
49. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med* 2003; 138(6): 502-5.

*Reimpresos:*

Lucía Nikolaia López-Bojorquez  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Departamento de Biología Celular,  
Circuito Exterior  
04510, México, D.F.  
Tel.: 5622-5609,  
Fax: 5622 56 11  
Correo electrónico: llopez@ifisiol.unam.mx

*Recibido el 9 de enero de 2003.  
Aceptado el 22 de agosto de 2003.*

# Papel de las isoformas de IκB en la activación del factor de transcripción NF-κB

Lucia Nikolaia López Bojorquez

Doctorado en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Fisiología Celular UNAM

Apartado Postal 70-243 México D.F. 04510 llopez@ifisiol.unam.mx

Key words: NF-κB, IκB, respuesta inmune innata, citocinas inflamatorias.

## Resumen

Las proteínas inhibitoras IκB regulan la actividad del factor transcripcional NF-κB al permitir su traslocación al núcleo tras su degradación específica. Prácticamente todas las vías de transducción de señales que involucran NF-κB, incluyen la fosforilación, ubiquitinación y degradación de IκB por parte del proteosoma. Se han identificado al menos seis isoformas de IκB, que son capaces de interactuar a su vez con distintos heterodímeros de NF-κB. Las isoformas que responden a los estímulos clásicos que regulan NF-κB como citocinas inflamatorias y antígenos bacterianos, son IκB-α, IκB-β y IκB-ε quienes interactúan de manera temporal y específica para activar distintas pozas del factor de transcripción. Por su parte las isoformas IκB-γ y Bcl-3 son específicas de ciertos tipos celulares, en particular de líneas mieloides y permiten un regulación fina de NF-κB durante el desarrollo y diferenciación del sistema inmune.

## Abstract

The IκB inhibitory proteins regulate the NF-κB transcription factor activity by controlling its translocation into the nucleus. All NF-κB mediated transcription pathways involve the phosphorylation, ubiquitination and degradation of IκB. There are reported six isoforms capable to interact with different NF-κB dimers in order to regulate their activity. The isoforms that degrade in response to classical stimulus such as inflammatory cytokines and bacterial antigens are IκB-α, IκB-β and IκB-ε. This process takes place at specific time points in to activate different NF-κB pools. On the other hand the isoforms IκB-γ and Bcl-3 are specific of some cellular types particularly myeloid lineage and allow a fine-tuning regulation during immune system development and differentiation.

**Abreviaturas:** TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-alfa, IL-1β: Interleucina-1beta, LPS Lipopolisacarido, PMA: forbol-meristato-acetato aa: aminoácido HIV: virus de inmuno- deficiencia humana SLN: secuencias de localización nuclear.

El factor de transcripción NF-κB se ha convertido en una de las proteínas reguladoras más estudiadas de los últimos 10 años. Fue descubierto como parte de la maquinaria de transcripción de los genes de la cadena κ de las inmunoglobulinas en linfocitos B (de ahí su

nombre). Ahora se le reconoce un papel privilegiado en una gran variedad de fenómenos celulares. Participa en la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la **respuesta inmune innata**, es crucial tanto para la secreción de productos proinflamatorios por parte de los macrófagos, como para la activación endotelial.

Los factores de transcripción son **proteínas de regulación génica** que reprimen o activan la transcripción genética. Estas proteínas actúan detectando ciertas secuencias de nucleótidos en la doble hélice de DNA, próximas al sitio de inicio de transcripción de los genes. A esta región proximal en el extremo 5' de un gene se le llama **promotor** ó **región promotora**, y contiene sitios de unión o secuencias específicas que son reconocidas con gran afinidad por los factores de transcripción y que regulan la actividad de cada gene.

NF-κB es entonces, una proteína que regula la transcripción genética al unirse a secuencias específicas localizadas en la región promotora de los genes blanco, y que funciona solamente en ciertas condiciones celulares, es decir es un **factor de transcripción inducible**.

Existen un gran número de factores de transcripción descritos hasta el momento y se agrupan en familias según su función y/o estructura.

La familia de factores NF-κB regula la expresión de una gran variedad de genes, en particular aquellos relacionados con el sistema inmune y el control de la proliferación celular. NF-κB es un homo/heterodímero constituido por diferentes subunidades proteicas que se conocen como **familia Rel**.

La familia Rel incluye genes que han sido altamente conservados durante la evolución de los vertebrados. En mamíferos se han descrito varias proteínas Rel: **p65**, **c-Rel**, **RelB**, **p105** quien es el precursor de **p50** y la proteína **p100** de donde proviene **p52**. Se han descrito también homólogos de miembros de la familia Rel en *Drosophila*, plantas e incluso en levaduras.

Los factores de transcripción inducibles, generalmente están asociados mecanismos que permiten

su función solamente bajo algún estímulo. El caso de NF- $\kappa$ B es un ejemplo interesante de cómo un factor de transcripción puede ser activado o desactivado mediante un complejo mecanismo que implica la interacción con otras proteínas reguladoras.

### El sistema NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B

De manera constitutiva, el dímero NF- $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma como un precursor inactivo formando un complejo con la **proteína inhibidora I $\kappa$ B**. Los C-terminal de NF- $\kappa$ B contiene secuencias de aminoácidos denominados **péptidos señal** o **secuencias de localización nuclear**, que determinan el destino (nuclear, en este caso) de las proteínas que los presentan. Esto quiere decir que el factor se localiza en el compartimiento citoplásmico, y su eventual traslocación al núcleo es el resultado de la exposición de estos péptidos señal. La interacción con I $\kappa$ B oculta una de las dos secuencias que determinan el destino nuclear de NF- $\kappa$ B. De manera que para viajar al núcleo, debe primero separarse de I $\kappa$ B. La traslocación al núcleo, es inducida por varios estímulos que finalmente convergen en la disociación entre NF- $\kappa$ B y su inhibidor I $\kappa$ B, dejando expuesta la región peptídica que determina su destino nuclear.

Los pasos necesarios para la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo son: fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma de la proteína inhibidora I $\kappa$ B. Una vez en el núcleo, el factor se une a la región promotora de los genes blanco y activa la transcripción (ver fig. 1) Esta es la razón por la que el estudio de la regulación de NF- $\kappa$ B esta centrada sobre todo, en la fosforilación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B y su degradación.

La fosforilación de I $\kappa$ B es llevada a cabo por el complejo multiproteico **IKK** (por las siglas en ingles de *I $\kappa$ B kinase*). La búsqueda de esta cinasa fue motivo de intenso estudio durante algunos años, ya que las evidencias bioquímicas apuntaban a que se trataba de una cinasa de muy alta especificidad por I $\kappa$ B. El complejo IKK contiene dos subunidades catalíticas (**IKK- $\alpha$**  e **IKK- $\beta$** ) encargadas de la fosforilación en sí, y una subunidad regulatoria llamada **IKK- $\gamma$** . Ya que la fosforilación de las distintas isoformas de I $\kappa$ B, constituye el punto medular de su regulación, el estudio de esta cinasa, ha cobrado interés particular en los últimos años. En uno de los escenarios mejor estudiados, IKK es activada por

la **cinasa NIK** (*NF- $\kappa$ B inducible kinase*) quien responde directamente a la acción de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  y a sus receptores membranales.

La interacción de IKK con su sustrato (I $\kappa$ B) y la fosforilación de los dos residuos conservados de serina en todas las isoformas de I $\kappa$ B, constituye la señal primaria que determina su degradación

La regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B ha resultado ser mas complicada, conforme se ha profundizado en su estudio. Hay que considerar por ejemplo que NF- $\kappa$ B se une al DNA como un dímero y en funcionalmente opera en forma de homo o heterodímero. Cada monómero es siempre un miembro de la familia Rel. Todas las proteínas Rel tiene una región conservada de 300 aa en el N-terminal llamado **dominio Rel** que es la responsable de la dimerización, la unión a DNA, y la interacción con las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B<sup>1</sup> (ver fig 2) Hay que mencionar que en realidad cuando nos referimos al factor NF- $\kappa$ B incluimos a una familia de heterodímeros que producen efectos transcripcionales diferentes entre sí o incluso antagónicos.

Esta revisión aborda aspectos que tienen que ver casi exclusivamente con los mecanismos regulatorios que recaen, no sobre NF- $\kappa$ B, sino sobre las proteínas inhibidoras que controlan su actividad: **las proteínas de la familia I $\kappa$ B**. Los aspectos que conciernen al factor, se abordan en otra revisión de carácter mas general y que se complementa con la presente<sup>18</sup> Al final de la sección de Bibliografía se enlistan algunas referencias correspondientes revisiones clásicas de la literatura existente de NF- $\kappa$ B y que pueden resultar de interes para el lector.

### La estructura de I $\kappa$ B

El complejo I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B ha sido cristalizado y su estructura molecular ha sido resuelta con detalle. El tamaño de las distintas isoformas de I $\kappa$ B es de 35 a 70 KDa es decir, su tamaño es menor que el que forma el dímero NF- $\kappa$ B (entre 90 y 120 kDa).

Todas las isoformas de I $\kappa$ B descritas hasta el momento reportadas son muy semejantes en estructura tridimensional aunque tienen distinto numero de **dominios repetidos de ankirina** que constituyen el sello característico de la molécula, y que forman los sitios de interacción con NF- $\kappa$ B.

### La familia I $\kappa$ B

La importancia de NF- $\kappa$ B dentro de distintos fenómenos biológicos ha quedado demostrada. Mucha de la investigación bioquímica acerca del su mecanismo de acción se ha enfocado, no solo al funcionamiento del factor en sí, sino en gran medida a caracterizar a las distintas

isoformas de IκB existentes y a la búsqueda de otras nuevas. La razón de esto resulta evidente en el sentido de que las diferencias que existen en la activación NF-κB están básicamente dirigidas a diferencias en la regulación de la fosforilación y degradación de las proteínas IκB que secuestran distintas poblaciones del factor. En esta sección se describen generalidades y particularidades concernientes a cada una de las isoformas de IκB que han sido identificadas hasta el momento en células de mamíferos.

Se han caracterizado al menos seis isoformas de la proteína inhibidora IκB. Las mejor caracterizadas son IκB-α y IκB-β que se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares y que son responsables de la mayor parte de la regulación de NF-κB. La otra isoforma que en los últimos dos años ha cobrado relevancia es IκB-ε, que participa en respuestas bifásicas y probablemente más específicas. A estas tres isoformas se les denomina IκB's pequeñas. También existe IκB-γ de la que se conocen un par de variantes y que proviene del mismo gene que el precursor p105 y que p50, y que se encuentra restringida a ciertos tipos celulares. Y por último Bcl-3 quien secuestra únicamente los homodímeros p50, p52 y p50:p52.

Alternativamente, existe otro mecanismo de liberación de NF-κB independiente de IκB. Este mecanismo concierne a los dímeros p50 y p52, ya que estos pueden ser producidos como precursores de alto peso molecular (p105 y p100 respectivamente) y han sido descritas como moléculas NF-κB Tipo I (ver fig. 1) cuya región C-terminal contiene repeticiones de ankirina y que ocultan las secuencias de localización nuclear del N-terminal de la misma proteína en la que se encuentran. Esta particular regulación se discutirá más adelante.

### IκB-α

Esta isoforma fue la primera descrita, y es también la mejor caracterizada. Fue identificada originalmente junto con IκB-β a partir de una purificación parcial. Tiene la cinética de degradación más rápida de estas proteínas. En casi todos los tipos celulares donde se ha probado, tanto TNF-α como PMA y IL-1β inducen una rápida y completa degradación de IκB-α desde los 5 min. Sin embargo esta degradación resulta transitoria ya que aparecen nuevamente niveles detectables de proteína a partir de 1h de estimulación. Los ensayos de *Northern Blot* han

demostrado que tras la degradación, existe un incremento significativo en la síntesis *de novo* de la proteína, esto además de una regulación positiva durante las siguientes 24 h permite el mantenimiento de los niveles intracelulares. La transcripción de IκB-α esta sujeta entonces a un circuito auto regulatorio inductor ya que es uno de los genes que primero se transcriben tras la entrada de NF-κB al núcleo.

Este mecanismo es un ejemplo interesante dentro de la biología molecular, de cómo un factor de transcripción puede regular su propia activada al promover la síntesis de la proteína que lo inhibe. Si bien existen algunos otros ejemplos en la literatura, el caso NF-κB/IκB, ha sido estudiado con particular atención

La estructura de IκB-α consiste de un dominio central con seis repeticiones de ankirina esenciales para su interacción con el factor. 35 residuos del C-terminal, contienen la **región PEST**, rica en aa cargados negativamente, e indispensable para su degradación en respuesta a estímulo. En el N-terminal, se encuentran los residuos de serina (ser 32 y ser 36) y de lisina (lis 51 y lis 52) sobre los que recaen las señales que regulan su actividad y también en esta región se encuentran los dominios de la proteína que enmascaran la señales de localización nuclear de NF-κB <sup>2</sup>

IκB-α regula además la actividad nuclear de NF-κB. Una característica de IκB-α es la presencia de secuencias únicas de exportación capaces de unir al receptor nuclear CRM1. La mutación de las secuencias NES de localización nuclear que contiene IκB o el uso de inhibidores del CRM1 (como leptomicina B) impiden la salida de IκB-α del compartimiento nuclear una vez que ha conseguido entrar <sup>3</sup>

La entrada de IκB-α al núcleo permite también mantener la respuesta de NF-κB frente a estímulos persistentes. Es decir, una subpoblación de IκB unido al factor de transcripción puede traslocarse al núcleo y degradarse *in situ* de manera paulatina para prolongar la actividad de NF-κB <sup>4</sup>

### IκB-β

Esta isoforma fue clonada utilizando como anzuelo, oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar por PCR, una región conservada de las secuencias de ankirina, de las cuales, esta proteína presenta seis repeticiones consecutivas. Es una proteína de 369 aa con un peso molecular aparente de 45 KDa. El C-terminal es rico en residuos de prolina, glutámico y serina. Contiene el mismo número de residuos de serina y de treonina que IκB-α, pero no presenta el sitio de fosforilación para PKC presente en esta isoforma.

La estructura de la molécula del RNA mensajero que codifica para IκB-β es única ya que presenta regiones cortas no traducida en ambos extremos, y no contiene, a



diferencia de I $\kappa$ B- $\alpha$ , secuencias AUUUA en el extremo 3' lo que sugiere que se trata de un mensajero no sujeto a un rápido recambio<sup>5</sup>

I $\kappa$ B- $\beta$  ha sido asociada con una respuesta **bifásica** y **persistente** de NF- $\kappa$ B. Se ha encontrado en distintos modelos que los tiempos a los que ocurre su degradación son en general, mas largos que los reportados para I $\kappa$ B- $\alpha$ . Esto se refiere a que tras un estímulo específico, la degradación de I $\kappa$ B- $\beta$  puede ser detectada a partir de los 40 min. Dependiendo del modelo celular, pueden variar estos tiempos, lo importante es que bajo la misma serie de estímulos, la primera de las tres isoformas en degradarse es I $\kappa$ B- $\alpha$ . La síntesis *de novo* de I $\kappa$ B- $\beta$  es mas tarda que la de I $\kappa$ B- $\alpha$  de manera que los niveles de esta isoforma de I $\kappa$ B en el citoplasma se normalizan con mas lentitud.

Al igual que I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  puede viajar al núcleo celular y adherir NF- $\kappa$ B activo, como parte de un eficiente mecanismo de inhibición de la transcripción, sin embargo no es capaz de romper las uniones funcionales NF- $\kappa$ B con la maquinaria de transcripción.

I $\kappa$ B- $\beta$ , se fosforila también en residuos de serina (serinas 32 y 36) y se ubiquitina en lisinas 21 y 22. Diversos experimentos han demostrado que existen en el N-terminal, dos serinas cuya fosforilación también es importante para la función de este inhibidor (serinas 19 y 23) ya que la sustitución de estas por alaninas previene su proteolisis. I $\kappa$ B- $\beta$  se encuentra constitutivamente fosforilado en una de estas dos serinas. La degradación inicial de I $\kappa$ B- $\beta$  en células B y en respuesta a LPS, es seguida de la síntesis *de novo* de esta proteína en una forma hipofosforilada. Esta se asocia con NF- $\kappa$ B libre previniendo su interacción con I $\kappa$ B- $\alpha$ . A diferencia del I $\kappa$ B- $\beta$  basalmente fosforilado el I $\kappa$ B- $\beta$  no fosforilado no es capaz de enmascarar las secuencias de localización nuclear de NF- $\kappa$ B y por lo tanto de inhibir su traslocación al núcleo. El NF- $\kappa$ B unido a I $\kappa$ B- $\beta$  hipofosforilado, retiene cierta capacidad de ingresar al núcleo y de activar la transcripción de manera que al competir con I $\kappa$ B- $\alpha$ , la forma hipofosforilada de I $\kappa$ B- $\beta$  permite que exista una población de NF- $\kappa$ B transcripcionalmente activo de manera persistente<sup>6</sup>

El espectro de proteínas Rel con que puede interactuar I $\kappa$ B- $\beta$  es prácticamente el mismo que I $\kappa$ B- $\alpha$ , aunque en algunos casos se ha observado que la fuerza de retención de I $\kappa$ B- $\beta$  puede ser menor es decir, aunque unen los mismos dímeros de NF- $\kappa$ B, la afinidad de I $\kappa$ B- $\alpha$  es en general mayor que la de I $\kappa$ B- $\beta$

En la mayoría de los modelos, la degradación de I $\kappa$ B- $\beta$  esta asociada con actividad prolongada de NF- $\kappa$ B. Donde la respuesta inicial es consecuencia de la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y I $\kappa$ B- $\varepsilon$  y la respuesta persistente se debe a la desaparición prolongada de I $\kappa$ B- $\beta$ <sup>7</sup>

#### I $\kappa$ B- $\varepsilon$

Esta es la ultima isoforma que se ha descrito<sup>8</sup>. Su estructura es muy similar a las otras isoformas descritas, con múltiples repeticiones de ankirina.

El mensajero de I $\kappa$ B- $\varepsilon$  posee diferente patrón basal de expresión a los de I $\kappa$ B- $\alpha$  y I $\kappa$ B- $\beta$ . Aunque también puede capturar distintos dímeros de NF- $\kappa$ B, se le ha implicado en la regulación de complejos de NF- $\kappa$ B que contienen c-Rel<sup>8</sup>

La degradación de I $\kappa$ B- $\varepsilon$  tiene una cinética parecida a la de I $\kappa$ B- $\beta$ , es decir ocurre a tiempos mas largos que I $\kappa$ B- $\alpha$ , sin embargo la síntesis *de novo* es mucho mas rápida de manera que los niveles basales de la proteína pueden restablecerse hasta 3 h después del estímulo. Esta recuperación coincide con la cinética de acumulación del mensajero que muestran los análisis de *Northern Blot*, y por esta razón se ha sugerido que I $\kappa$ B- $\varepsilon$  puede regular un tipo de respuesta de NF- $\kappa$ B, lento y transitorio<sup>8</sup> Como las otras I $\kappa$ B's pequeñas I $\kappa$ B- $\varepsilon$  se degrada también en respuesta a IL-1 $\beta$  y LPS.

Se ha observado en células endoteliales, que la cinética de degradación de I $\kappa$ B- $\varepsilon$ , coincide con la expresión de un subgrupo de genes regulados por c-Rel, la molécula de adhesión V-CAM en particular, lo cual correlaciona con el hecho de que I $\kappa$ B- $\varepsilon$  tiene cierta preferencia por el dímero p65:c-Rel<sup>9</sup>

#### I $\kappa$ B- $\gamma$

Esta isoforma de 607 aa se produce a partir de un *splicing alternativo* del precursor p105. Es decir a partir del mismo transcrito primario, codificado en el mismo gene (el mismo que codifica para p105 y p50) pueden traducirse distintas proteínas mediante la edición del mRNA. Los primeros estudios bioquímicos demostraron que la región C-terminal de p105 es idéntica a la proteína I $\kappa$ B- $\gamma$  de 70-kDa. Se han identificado también otras dos isoformas de menor peso molecular que provienen del mismo gene, con pesos moleculares de 63 KDa y 55 KDa denominadas respectivamente I $\kappa$ B $\gamma$ -1 e I $\kappa$ B $\gamma$ -2. I $\kappa$ B $\gamma$ -1 puede ser encontrada en el citoplasma y núcleo mientras I $\kappa$ B $\gamma$ -2 es de localización preferentemente nuclear, ambas tienen distintas actividades inhibitoras y tienen distintas afinidades relativas por p50.

I $\kappa$ B- $\gamma$  se expresa en un número muy discreto de tipos celulares y tiene una marcada preferencia por homodímeros de p50 y c-Rel. Por esta razón existe poca literatura con respecto a su regulación.



Debido a que tanto p50 como I $\kappa$ B- $\gamma$  provienen del gene que codifica también p105 (ver mas adelante), la traslocación del dímero p50:p50 al núcleo puede provenir de mas de una fuente. Se ha propuesto que en modelos donde se observa traslocación preferencial de homodímeros de p50, estos provienen de la degradación específica de I $\kappa$ B- $\gamma$ . En algunos modelos como en lesiones isquémicas se observa una traslocación continua de p50:p50 activada por I $\kappa$ B- $\gamma$  y asociada a una disminución en los niveles de p105 <sup>10</sup>

### Bcl-3

Fue caracterizada inicialmente como oncogene a partir de un linfoma crónico de células B. Aunque estructuralmente es muy parecido al resto de los miembros de la familia I $\kappa$ B (tiene siete dominios de ankirina) su función parece ser completamente distinta <sup>11</sup>

De todas las isoformas conocidas de I $\kappa$ B, Bcl-3, es la única que no es degradada por acción de las vías clásicas de activación de NF- $\kappa$ B. De hecho su localización es preferentemente nuclear y parece estimular el potencial transcripcional de NF- $\kappa$ B. Bcl-3 generalmente captura homodímeros de p52 y p50 y se cree que puede tener distintos efectos sobre la unión de estos al DNA dependiendo de su estado de fosforilación, de su concentración intracelular y de su interacción con factores nucleares <sup>12</sup>. Lo que es claro, es que puede traslocarse al núcleo ya sea libre o unido al NF- $\kappa$ B y regular su actividad transcripcional. Por ejemplo puede disociar a p50 y p52 de la cromatina, o puede competir por p50 en la formación de un heterodímero con p52. Alternativamente, Bcl-3 puede formar complejos terciarios con los homodímeros de p50 o p52 unidos a DNA y actuar como un activador transcripcional. Esta interacción puede ser estimulada por la acetilasa de histonas Tip60.

La sobreexpresión de Bcl-3 aumenta las cantidades del dímero p50 en el núcleo de células de timo y células B. El mecanismo involucrado parece ser la captura de p50 de los complejos p105:p50 sin que se incremente el procesamiento de p105 <sup>13</sup>

La formación del complejo Bcl-3:p50 es inducida por una variedad de agentes activadores de NF- $\kappa$ B y depende de la actividad enzimática del proteosoma pero es independiente de la traslocación al núcleo de p50:p65, lo cual sugiere, que los homodímeros de p50 provienen de la degradación de p105 <sup>12</sup>

### Regulación diferencial de I $\kappa$ B- $\beta$ y I $\kappa$ B- $\alpha$

Todos los inductores conocidos de NF- $\kappa$ B, producen degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , sin embargo solo una fracción de ellos inducen degradación de I $\kappa$ B- $\beta$ . Entre los estímulos que degradan I $\kappa$ B- $\beta$  destacan LPS, IL-1 y la proteína tax de HIV-1. Aunque la caracterización inicial sugería que I $\kappa$ B- $\beta$  resulta insensible al estímulo por PMA o TNF- $\alpha$ , ahora se sabe que esto depende del tipo celular en cuestión y que la degradación en respuesta a TNF- $\alpha$  por ejemplo ocurre con una cinética distinta a la de I $\kappa$ B- $\alpha$  (18)

Cuando NF- $\kappa$ B se trasloca al núcleo, uno de las primeras proteínas en producirse es I $\kappa$ B- $\alpha$ , que una vez en el citoplasma, secuestra el factor remanente inactivando la recién encendida señal. Si la señal de activación inicial también conlleva la degradación de I $\kappa$ B- $\beta$ , como este se fosforila mas lentamente, puede secuestrar al NF- $\kappa$ B remanente y prevenir su interacción con I $\kappa$ B- $\alpha$

En la mayoría de los modelos estudiados, la activación persistente de NF- $\kappa$ B parece ser en parte proveniente de I $\kappa$ B- $\beta$  ya que al tener una cinética de fosforilación mas lenta, permite una respuesta bifásica que se observa como un segundo pico en la traslocación del factor.

*In vivo*, I $\kappa$ B- $\alpha$  parece ser un inhibidor mas potente de la actividad de NF- $\kappa$ B que I $\kappa$ B- $\beta$ , esta habilidad correlaciona directamente con la habilidad de I $\kappa$ B- $\alpha$  de unir al factor tanto *in vivo* como *in vitro*. De hecho I $\kappa$ B- $\alpha$  puede traslocarse al núcleo en ciertas condiciones, disociar a NF- $\kappa$ B del DNA y transportarlo de regreso al citoplasma, en un proceso que depende de la presencia de una secuencia de exportación, sensible a leoptimicina-B, que bloquea la exportación nuclear <sup>14</sup>

### Degradación de p100 y p105

Las proteínas p52 y p50 provienen de la proteólisis de p100 y p105. Sin embargo, poco se sabe acerca de esta vía de activación de NF- $\kappa$ B (ver fig 2). A partir del mismo gene puede producirse un precursor de mayor peso molecular que en el extremo N-termino, contiene la secuencia que corresponde al factor de transcripción y en el extremo C-termino, las secuencias repetidas de ankirina que en la estructura tridimensional de la proteína, se asocian a la región N-terminal (ver fig. 2) inhibiendo la traslocación nuclear y la actividad del factor

De manera que aunque p50 y p52 pueden originarse a partir de la proteólisis parcial de p100 y p105, la poza constitutiva de estos homodímeros, no proviene de la degradación de sus precursores. Para la poza constitutiva (la que después se asocia con p65 por ejemplo) la degradación ocurre co-traduccionalmente, es decir, que confirme la proteína es sintetizada en el ribosoma, se degrada la región correspondiente al C-termino.

Entender la regulación de p100 y de p105, es entender una serie de **degradaciones parciales** que pueden ocurrirle al mismo precursor.

Todos estos ejemplos, resultan particularmente interesantes para la biología celular ya que es uno de las raras muestras en los que una molécula es degradada solamente de **forma parcial** por el proteosoma <sup>16</sup>. Aunque resulta sorprendente, el precursor p105 además de producir p50, puede también formar de la isoforma IκB-γ. En la secuencia primaria de esta proteína, los residuos 376-404, son necesarios para el procesamiento y sirven como señal de *stop* para la maquinaria proteosomal y las lisinas localizadas en las posiciones 441 y 442 sirven como señal de ubiquitinación. Es decir, también a partir del precursor p105, se puede obtener al inhibidor IκB-γ llevando a cabo proteólisis parcial. Las secuencias necesarias para este proceso se encuentran en los primeros 550 aa.

La vía de degradación de p105 para la obtención de p50, puede ser inducida por estímulos específicos. Estudios recientes sugieren que los estímulos clásicos de activación de NF-κB como TNF-α, IL-β y PMA inducen la degradación de p105 a través de IKK-α y IKK-β. En estos casos, una región de 23 aa cercana al C-terminal y rica en residuos de glicina funciona como señal de procesamiento para su rompimiento hacia p50, esta misma secuencia es interesante, ya que puede dirigir una proteólisis específica cuando se inserta mediante técnicas de biología molecular a otras proteínas <sup>15</sup>.

La porción C-terminal de p105 esta involucrada en la regulación y es donde se localizan los sitios de fosforilación por IKK. Por otro lado el papel de p105 como inhibidor de NF-κB, depende de fosforilación dependiente de señal y esta regulación no ha sido del todo estudiada. Este modelo descrito solamente en células humanas constituye un importante ejemplo de los mecanismos regulatorios que conciernen al proteosoma.

Es importante señalar que la degradación de p105 regulada por IKK, es decir, la que ocurre como parte de una cascada de señales, es llevada a cabo por el complejo SCF<sup>β-TrCP</sup> de ubiquitina-ligasa a diferencia de la proteólisis constitutiva para generar la poza constitutiva de p50 (1). Es decir que en el proteosoma se generan de manera independiente, distintos tipos de degradación a partir del mismo precursor. Uno de ellos esta

dirigido por la señal de fosforilación de p105 y de los estímulos encargados de generar p50 activo que se traslocará al núcleo, y el otro para generar una población de p50 destinada a asociarse con p65 u otros heterodímeros que a su vez se unirán a inhibidores IκB. Esta última ocurre co-traduccionalmente, es decir simultáneamente a la síntesis del precursor, y los mecanismos que la dirigen no han sido descritos hasta el momento.

El gene que codifica para p100 (NFKB1) fue uno de los primeros de esta familia en ser caracterizados. Fue originalmente descrita por su potencial de transformación celular, ya que su fusión con el gene Cα de inmunoglobulinas (que puede ocurrir espontáneamente debido a su cercanía física) se asocia a algunas leucemias de células B. Por esta razón era conocido anteriormente como el oncogene *Lyt-10*.

p100 es la única molécula inhibidora capaz de asociarse con la subunidad Rel-B. La regulación de Rel-B es distinta a la de las otras subunidades transactivadoras (p65, p50 y c-Rel) Su actividad no es regulada aparentemente por ninguna de las IκB pequeñas. Solamente IκB-α tiene una capacidad muy pobre de unión a esta proteína. Rel-B ha sido descrito como el miembro de la familia de NF-κB que contribuye a la poza constitutiva de este factor. Aunque fue originalmente descrito como un inhibidor de la actividad de NF-κB, ya que no puede formar homodímeros y no une directamente DNA, Rel-B puede asociarse con p50 y p52 y adquirir así, una fuerte capacidad transcripcional. Sin embargo la expresión de RelB esta restringida a tejidos linfoides, como el timo, ciertas áreas del bazo y los nódulos linfáticos.

RelB se une con p100 en el citoplasma, resultando crucial para esta asociación los aminoácidos 623-900 de la secuencia primaria del factor. Al igual que con p105, La porción C-terminal de p100 contiene las señales de localización nuclear necesarias para la remoción de RelB del núcleo, (ver fig 2)

La vía NIK/ IKK-α esta implicada en el procesamiento de p100. De hecho la cinasa NIK es responsable de la fosforilación directa de p100 y de la localización nuclear de Rel-B <sup>17</sup>. Esta fosforilación de p100 que servira después como señal de ubiquitinación y degradación en el proteosoma ocurre en las serinas 867 y 870.

Por otro lado la proteólisis dirigida de p100 da origen a la subunidad p52, por un mecanismo muy similar a la síntesis de p50, es decir ocurre co-traduccionalmente y requiere regiones ricas en glicina localizadas en el N-terminal <sup>15</sup>

## Interacción de IκB con IKK

Como se ha mencionado, IKK es el complejo multiproteico encargado de la fosforilación de las distintas IκB's. Estudios *in vitro* han demostrado que las tres isoformas más comunes de IκB (α, β y ε) pueden interactuar con la cinasa de IκB (IKK) y que prácticamente todos los miembros de la familia Rel (p65, RelB, cRel, p100 y p105) también tienen esta capacidad. Estas proteínas son capaces de formar complejos estables y pueden ser co-purificadas con IKK. De hecho si se utilizan como sondas, péptidos que corresponden tanto al C- como al N-terminal de IκB-α, -β y -ε pueden encontrarse interacciones de alta afinidad con el complejo multiproteico IKK y estos péptidos son fosforilados *in vitro* secuencialmente. El péptido correspondiente al C-terminal de IκB-α es capaz por sí solo, de activar esta actividad de cinasa *in vitro*, lo cual es congruente con los datos que sugieren que el extremo carboxilo juega un papel en la regulación de su degradación.

## La compleja regulación de NF-κB esta dada por las distintas isoformas de IκB

Como se ha visto, la regulación de NF-κB es un fenómeno complejo y multifactorial. Hay que resaltar que en una misma célula existen distintas poblaciones del factor NF-κB, que son sensibles a distintos estímulos y que están sujetos a complicados mecanismos de regulación. Por un lado la posibilidad de formar heterodímeros distintos, permite la traslocación de diferentes actividades de NF-κB al núcleo ya que como se ha discutido cada distinto heterodímero puede tener distinta actividad transcripcional, pero por otro lado, una población de heterodímeros equivalentes puede estar secuestrada por distintas proteínas IκB. Por ejemplo, el dímero formado por las subunidades p50/p65 puede estar retenido en el citoplasma tanto por IκB-α, como por IκB-β y por IκB-ε, cada una de manera independiente, estableciéndose con ello tres subpoblaciones del mismo factor que pueden acceder al núcleo bajo distintos estímulos, o que pueden ser **liberados secuencialmente** permitiendo una actividad sostenida de NF-κB. Es esta variedad de posibilidades la que permite la versatilidad que se ha encontrado en este factor y la multiplicidad de fenómenos en los que participa, y mucha de esta versatilidad esta determinada por todas las distintas poblaciones de IκB que pueden interactuar con el.

Si bien las distintas isoformas no están presentes en todos los tipos celulares y muchos de estos mecanismos están restringidos a ciertas condiciones, las vías que aquí se describen, constituyen interesantes ejemplos en la bioquímica de transducción de señales

Así, en este momento queda claro que una parte importante de la regulación de NF-κB recae sobre las proteínas inhibitoras IκB. Por esta razón ha cobrado suma importancia el estudio de las señales que convergen en la fosforilación y degradación de estas proteínas ó en los distintos mecanismos a través de los cuales regula NF-κB

## Bibliografía

1. Muller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-7. (1995).
2. Luque, I. & Gelinas, C. Distinct domains of I kappa B alpha regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus. *Mol Cell Biol* 18, 1213-24. (1998).
3. Tam, W. F., Lee, L. H., Davis, L. & Sen, R. Cytoplasmic sequestration of rel proteins by I kappa B alpha requires CRM1- dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 2269-84. (2000).
4. Renard, P. et al. Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I kappa B alpha. *J Biol Chem* 275, 15193-9. (2000).
5. Haskill, S. et al. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 65, 1281-9. (1991).
6. Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I. & Ghosh, S. Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 16, 5444-9. (1996).
7. Bourke, E., Kennedy, E. J. & Moynagh, P. N. Loss of I kappa B-beta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells. *J Biol Chem* 275, 39996-40002. (2000).
8. Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R. & Israel, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16, 1413-26. (1997).
9. Spiecker, M., Darius, H. & Liao, J. K. A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol* 164, 3316-22. (2000).
10. Yeh, K. Y., Yeh, M., Glass, J. & Granger, D. N. Rapid activation of NF-kappaB and AP-1 and target gene expression in postischemic rat intestine. *Gastroenterology* 118, 525-34. (2000).
11. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60 (1998).
12. Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F. G. & Scheidereit, C. NF-kappaB p105 is a target of I kappa B kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J* 18, 4766-78. (1999).
13. Watanabe, N., Iwamura, T., Shinoda, T. & Fujita, T. Regulation of NFKB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50- p105 and nuclear translocation. *Embo J* 16, 3609-20. (1997).
14. Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T. & Dargemont, C. Nuclear retention of I kappa B alpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274, 9108-15. (1999).
15. Lin, L. & Ghosh, S. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16, 2248-54. (1996).
16. Orian, A. et al. Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF- kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol* 19, 3664-73. (1999).



17. Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. & Paya, C. V. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277, 1405-18. (2002).
18. López-Bojorquez L N. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B, un importante mediador de la respuesta inmune innata. *Rev Invest Clin*. En prensa (2004).

## Lecturas recomendadas

Revisiones donde se abordan aspectos generales de la regulación de NF- $\kappa$ B

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12: 141-79. PMID: 8011280

Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 1996 Oct 4; 87(1): 13-20. PMID: 8858144

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 621-63. PMID: 10837071

Sun Z, Andersson R. NF- $\kappa$ B activation and inhibition: a review. *Shock*. 2002 Aug; 18(2): 99-106. Review. PMID: 12166787

Revisiones donde se abordan aspectos particulares de la regulación de NF- $\kappa$ B

May MJ, Ghosh S. I $\kappa$ B kinases: kinsmen with different crafts. *Science*. 1999 Apr 9; 284(5412): 271-3. PMID: 10232975

Beg AA, Baldwin AS Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kB transcription factors. *Genes Dev*. 1993 Nov; 7(11): 2064-70. PMID: 8224838

Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF-kappa B and I $\kappa$ B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med*. 1994 Feb 1; 179(2): 503-12. PMID: 7507507

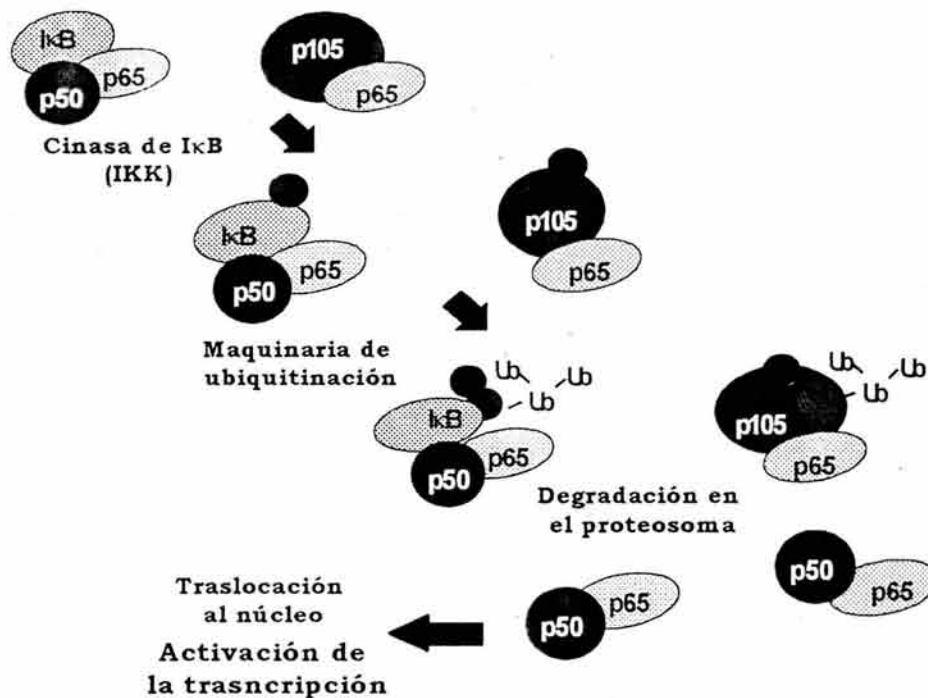
Karin M. How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999 Nov 22; 18(49): 6867-74. PMID: 10602462

Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends Cell Biol*. 2000 Apr; 10(4): 129-33. PMID: 10740266

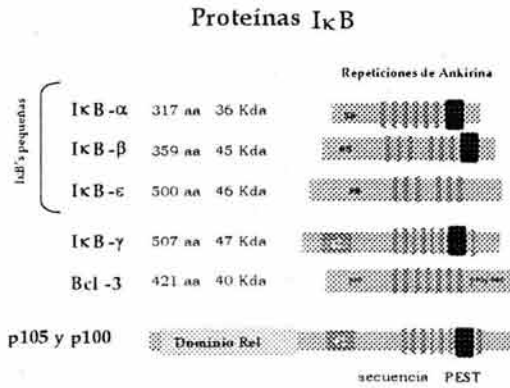
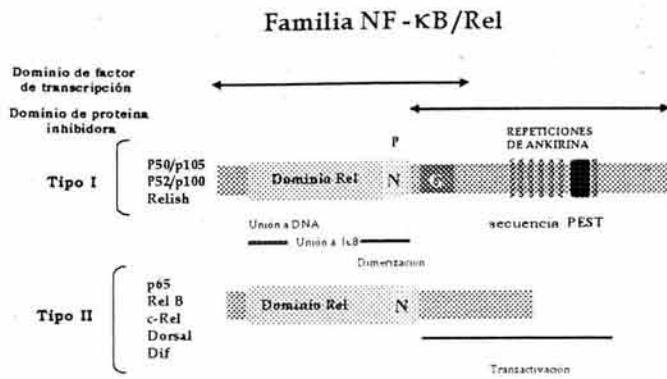
Tak PP, Firestein CS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan; 107(1): 7-11. PMID: 1113417

Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002 Mar; 3(3): 221-7. Review. PMID: 11875461

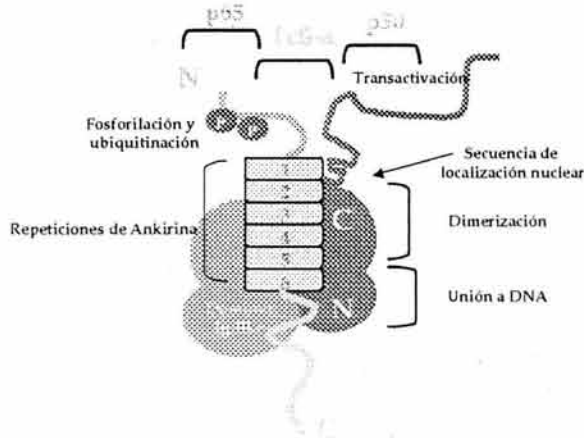
Nota: Estos artículos están disponibles en línea en la pagina del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>  
Se anexa al final de la cita, el numero de identificación para facilitar su acceso (PMID)



**Figura 1** Mecanismo básico de activación de NF- $\kappa$ B. La fosforilación y subsiguiente degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B, es necesaria para la traslación del factor al núcleo. En esta figura se muestra tanto la activación clásica que depende de la degradación total de I $\kappa$ B, como la activación dependiente de la degradación parcial del precursor p105



**Figura 2** Estructuras de distintos miembros de la Familia Rel y de la Familia I $\kappa$ B. Modificada de (13)  
 G:sitio rico en glicina P:sitio consenso de fosforilación N:secuencia de localización nuclear



**Figura 3** Representación de la estructura tridimensional de I $\kappa$ B- $\alpha$  unido al dímero p50/p65. Las repeticiones de ankirina interactúan directamente con la SLN del factor de transcripción.



## NF- $\kappa$ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$

L. N. López-Bojórquez<sup>1</sup>, F. Arechavaleta-Velasco<sup>2</sup>, F. Vadillo-Ortega<sup>3</sup>, D. Sánchez-Montes<sup>1</sup>, J. L. Ventura-Gallegos<sup>1</sup> and A. Zentella-Dehesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior S/N Ciudad Universitaria, P. O. Box 70-243, México D.F. 04510, México, Fax: ++52 56 22 56 11, e-mail: llopez@ifisiol.unam.mx

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Gineco-obstetricia Num. 4, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F. 01019, México

<sup>3</sup> Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología SS, Montes Urales 800, México D.F. 11000, México

Received 5 October 2003; returned for revision 2 December 2003; accepted by A. Falus 19 May 2004

**Abstract.** Over-expression of the immune response can lead to pathological conditions such as septic shock or chronic inflammation. Endothelial cell activation by pro-inflammatory products of activated macrophages plays a key role in these conditions. Here we examine the response of primary human endothelial cells (HUVEC) to conditioned media (CM) obtained from LPS-activated macrophages. We show that, as expected, CM induced NF- $\kappa$ B translocation, as well as adhesion capacity in HUVEC. We further show that this response is critically dependent on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  naturally present in the CM. However, both the amplitude of NF- $\kappa$ B translocation and adhesiveness observed with CM were well beyond the saturation levels attained after the sole stimulation with recombinant TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , either separately or together. We further characterized the translocation of NF- $\kappa$ B in the presence of CM by studying the degradation rate of individual I $\kappa$ B isoforms. Our results show that CM induced a faster degradation of the I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$  isoforms than the recombinant cytokines, leading to an enhanced recruitment of NF- $\kappa$ B activity. The above results suggest that the physiological context of factors co-secreted by LPS-activated macrophages enhances TNF- $\alpha$  mediated endothelial activation. The role of CM potentiation in the over-response of the immune system during acute inflammatory diseases is discussed.

**Abbreviations:** CM conditioned media by LPS-activated macrophages, LPS lipopolisaccharide, EMSA electrophoretic mobility shift assay, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, HUVEC human umbilical vein endothelial cells, I $\kappa$ B inhibitor of NF- $\kappa$ B, IFN- $\gamma$  interferon-gamma, IL-1 $\beta$  interleukin 1-beta, NF- $\kappa$ B nuclear factor  $\kappa$ B, PMA phorbol myristate acetate, PMSF phenylmethylsulfonyl fluoride, PAGE

polyacrylamide gel electrophoresis, TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor-alpha, VCAM vascular cell adhesion molecule. 1 eq 1 equivalent

**Key words:** Innate immunity – Inflammation – LPS-activated macrophage inflammatory products – Conditioned Media – HUVEC

### Introduction

Imbalances of the innate immune response lead to an exacerbated recruitment of different cell populations during pathological conditions such as septic shock or chronic inflammation [1]. Macrophages secrete a variety of pro-inflammatory products, including cytokines such as TNF- $\alpha$  [2], IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18, and their modulators [3]. One of the primary cellular targets of these inflammatory cytokines and modulatory factors is the endothelial cell, whose activation is crucial during inflammatory processes. This activation triggers a change from a non-thrombogenic surface to one in which circulating cells adhere to the apical membrane of endothelial cells [4]. Increased expression of cell adhesion molecules such as I-CAM, V-CAM and E-selectin are characteristic of the altered gene expression pattern of the activated endothelial cell [5, 6]. This process in particular leads to thrombogenesis and extravasation of leukocytes into the tissues [7]. At the molecular level, endothelial cell activation is characterized by the translocation of the transcription factor NF- $\kappa$ B into the nucleus and an immediate NF- $\kappa$ B-dependent gene activation [6, 8, 9]. In its inactive form NF- $\kappa$ B is bound to a family of cytoplasmic inhibitory proteins that include I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , and I $\kappa$ B- $\epsilon$  [9, 10], which have to be degraded to release NF- $\kappa$ B. While the degradation of the I $\kappa$ B- $\alpha$  iso-

form has been associated with the rapid and transient NF- $\kappa$ B activation, slower degradation kinetics of the other isoforms is linked to chronic or long-term NF- $\kappa$ B regulation [11].

A variety of recombinant cytokines are known to be able to elicit the phosphorylation of I $\kappa$ B isoforms with the subsequent translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus [9, 12]. Furthermore, modulatory interactions among cytokines have been described [3, 8]. In the case of endothelial cells, TNF- $\alpha$  has been shown to elicit NF- $\kappa$ B translocation and expression of adhesion molecules and this effect can be further potentiated by IFN- $\gamma$  [13]. Whether endothelial activation by recombinant cytokines resembles the response induced by the physiological context of factors secreted by activated macrophages is not known.

Here we address this issue by examining the response of primary human endothelial cells (HUVEC) to conditioned media (CM) obtained from LPS-activated macrophages as compared to recombinant cytokines. Our results show that among the naturally occurring cytokines, TNF- $\alpha$  and IL1 $\beta$  are both necessary and sufficient to elicit HUVEC activation response. We show, however, that CM stimulation resulted in a more robust activation and more sustained NF- $\kappa$ B nuclear translocation. We further characterized the translocation of NF- $\kappa$ B in the presence of CM, as well as the degradation rate of individual I $\kappa$ B isoforms. Our results show that CM induced a faster degradation of the I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$  isoforms than the recombinant cytokines, resulting in an enhanced NF- $\kappa$ B activation and the potentiated response induced by CM.

## Material and methods

### Cell cultures

Primary human umbilical vein cells (HUVEC) were obtained as reported by Jaffe et al., 1973 [14]. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in 199 medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY), supplemented with 10% certified grade FBS (In vitro, D. F. Mexico), 1% glutamine (SIGMA, St Louis, Mo), 20  $\mu$ g/ml endothelial mitogen (Biomedical Technologies, Stoughton, Ma) and 100  $\mu$ g/ml heparin (SIGMA, St Louis, Mo). Cells were grown in plastic plates (Costar, Cambridge, Ma) and were used for all the reported experiments in their third or fourth passage. Every experiment was performed with a different stock of HUVEC. U937 cells were obtained from the ATCC and cultured in RPMI media supplemented with 10% FBS and grown under endotoxin-free conditions. L929 cells were obtained from the ATCC and grown in MEM (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS (In vitro, D. F. Mexico).

### Adhesion assay

HUVEC were grown to confluence in 48 well plates and U937 cells were labeled with 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK) for 48 h. Confluent HUVEC were stimulated for 3 h with different cytokines or CM and washed twice with PBS.  $1 \times 10^5$  U937 cells, previously labeled and washed, were added to each well containing quiescent or activated HUVEC. Cell adhesion was allowed to take place during the following 3 h. Non-adherent U937 cells were removed by aspiration and washed three consecutive times with PBS. The remaining adherent cells were lysated with 0.5 ml of 2 M NaOH, and the radioactivity was measured in a scintillation counter (Beckman LS6000SC, St Louis, Mo). The adhesion level was expressed as the percent of adherent cells with respect to the total of U937 cells added per well.

### Nuclear and cytoplasmic cell extracts

After treatment, HUVEC (107 cells) were washed with cold PBS and collected using a rubber scraper. The cell pellet was obtained by centrifugation at 400  $\times$  g. After freezing in a dry ice bath, the cells were broken by allowing them to thaw in hypotonic buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT). Nuclei were separated from the cytoplasmic fraction by centrifugation at 800  $\times$  g. The supernatant was diluted 1:1 in dilution buffer (Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, glycerol 20%, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM) for protein assay and further use in cytoplasmic I $\kappa$ B analysis by Western blot. The nuclear fractions were recovered and re-suspended in hypertonic buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), and maintained with gentle agitation at 4°C for 30 min. After centrifugation at 16,000  $\times$  g for 25 min, the supernatants containing the transcription factors were collected in dilution buffer. Bradford reagents for protein determination were from Bio-Rad (BioRad, Hercules, Ca).

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Ten micrograms of the nuclear protein extracts were incubated with  $\gamma$ -ATP [<sup>32</sup>P]-labeled oligonucleotide containing the decameric kB site (5'AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC 3'), or the mutated  $\kappa$ B oligonucleotide (5'AGTTGAGGGCGACTTTCCAGGC 3'), (Santa Cruz, Sta Cruz, Ca). The binding reactions were carried out by incubating on ice for 40 min in a reaction buffer (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly-dI-dC) (Amersham-Pharmacia, Uppsala Sweden). The reaction mixture was loaded onto a 7.5% non-denaturing polyacrylamide gel and resolved at 120 V for 4 h. The gel was dried and the DNA-protein complexes were visualized by exposing the gel to a Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics, San Francisco, Ca). The screen was read in a Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics, San Francisco, Ca) and analyzed with ImageQuant software (Molecular Dynamics, San Francisco, Ca). To assess the identity of the different NF- $\kappa$ B subunits, the same procedure was used except that 2  $\mu$ g of the antibodies against p50, p65, or c-Rel (Sta. Cruz, Sta. Cruz, Ca) were added to the nuclear extracts 30 min after addition of the  $\kappa$ B probes.

### Western blot

30  $\mu$ g of the cytoplasmic protein extracts were boiled in sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8 1% v/v SDS, 10% v/v glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% v/v 2-mercaptoethanol) for 5 min. Samples were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a Hybond-ECL membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were probed with rabbit antiserum to human I $\kappa$ B- $\alpha$  (C-21), I $\kappa$ B- $\beta$  (C-20), I $\kappa$ B- $\epsilon$  (M-121) or p65 (sc-109) (Sta. Cruz, Sta. Cruz, Ca) diluted 1:500 in TBS. After washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase linked to antirabbit immunoglobulin (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) or anti-mouse immunoglobulin (PIERCE, Rockford, IL). The signals were detected by enhanced chemiluminescence using the Supersignal system (PIERCE, Rockford, IL). The signals on the blots were normalized against the Coomassie stain signal of the nontransferred portion of the gel, and quantified by densitometry.

### Conditioned media

Preparations of secretion products from LPS-activated macrophage-like cells were obtained following previously described protocols [15] with slight modifications. Accordingly,  $5 \times 10^5$  U937 cells/ml were differentiated by incubation with 0.1  $\mu$ M PMA (SIGMA, St Louis, Mo) for 12 h, and washed 3 times with PBS. Cells were maintained in RPMI supplemented with 10% FBS. After 72 h, activation was induced with 0.1  $\mu$ g/ml LPS (SIGMA, St Louis, Mo) for 20 min. In order to elimi-

nate the excess LPS, the medium was removed, and adherent cells were washed three times with PBS, which further removed any LPS-containing medium. Fresh RPMI with no phenol red and no serum was added to the activated cells, and was left enough time to 3 h had elapsed after the addition of LPS. The conditioned medium was centrifuged for 15 min at  $5,000 \times g$ , passed through a  $0.2 \mu\text{m}$  filter. CM was kept at  $4^\circ\text{C}$  until usage. Bradford reagents for protein determination were from Bio-Rad (BioRad, Hercules, Ca) For the CM prepared without LPS the procedure was the same (including in vitro differentiation), except for the LPS activation. In a set of control experiments, for both adhesion assays and NF- $\kappa$ B translocation, no difference was observed between adding this control CM and the standard non-stimulated HUVEC cultures (see fig. 1A); in most experiments, however, this control is not shown. All independent CM stocks were calibrated and adjusted before the experiments in order to use a dose equivalent, in terms of both biological activity and TNF- $\alpha$  content, to 1 ng/ml of recombinant cytokine (1 eq).

### CM neutralization

1 mg/ml polymixin B (PolB) was pre-incubated with the CM for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  prior to adding CM to HUVEC. This PolB dose is enough to inhibit the adhesion response induced by  $10 \mu\text{g/ml}$  of LPS.

Neutralizing antibodies against TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) were pre-incubated with the CM for 1 h at  $25^\circ\text{C}$  prior to adding CM to HUVEC. Previous experiments have shown that this antibody concentration was enough to block the adhesion response induced by  $10 \text{ ng/ml}$  of recombinant cytokine.

### Cytokine ELISA

TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  determination was performed with commercial kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's recommended protocol with minor modifications. The amounts of reagents used were:  $50 \mu\text{l}$  well of the primary antibodies ( $2 \mu\text{g/ml}$ ),  $100 \mu\text{l}$  of the standards or experimental samples, and  $1 \mu\text{l}$  of the biotinylated secondary antibody (coupled to streptavidine-alkaline phosphatase) diluted 1/1000. Development was done with  $100 \mu\text{l}$  of p-nitrophenyl-phosphate ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) as substrate. The O. D. was read at  $450 \text{ nm}$  in an ELISA reader (Biotech Instruments Inc., Winooski, Vt).

### Cytotoxicity assay

The biological TNF- $\alpha$  activity in the CM was determined as previously described [16]. The L929 cells were grown in 96 well plates ( $1.2 \times 10^4$  cells/well). For the assay, the cells were incubated in DMEM supplemented with 10% SFB and  $1 \text{ mg/ml}$  of actinomycin D (SIGMA, St Louis, Mo) and added with sequential two-fold dilutions of the CM. A standard curve of rhTNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, Mn) was included in every assay. After 12 h, the cells were fixed with 4% p-formaldehyde, and stained with crystal violet (0.4%). The fixed stain was re-dissolved with 10% acetic acid, and the O. D. was read at  $590 \text{ nm}$  using an ELISA reader (Biotech Instruments Inc., Winooski, Vt). The results were expressed as the percent viability, compared to untreated control.

### Statistical analysis

All the EMSA and western blot assays shown here are the representative results of at least 4 individual experiments performed with independent cell cultures each. The adhesion assays are reported as the mean values of at least 5 independent experiments, each one performed in triplicate. The error bars indicate  $\pm 1$  standard error of the mean. Data sets were analyzed using two-tailed Student's *t* test.

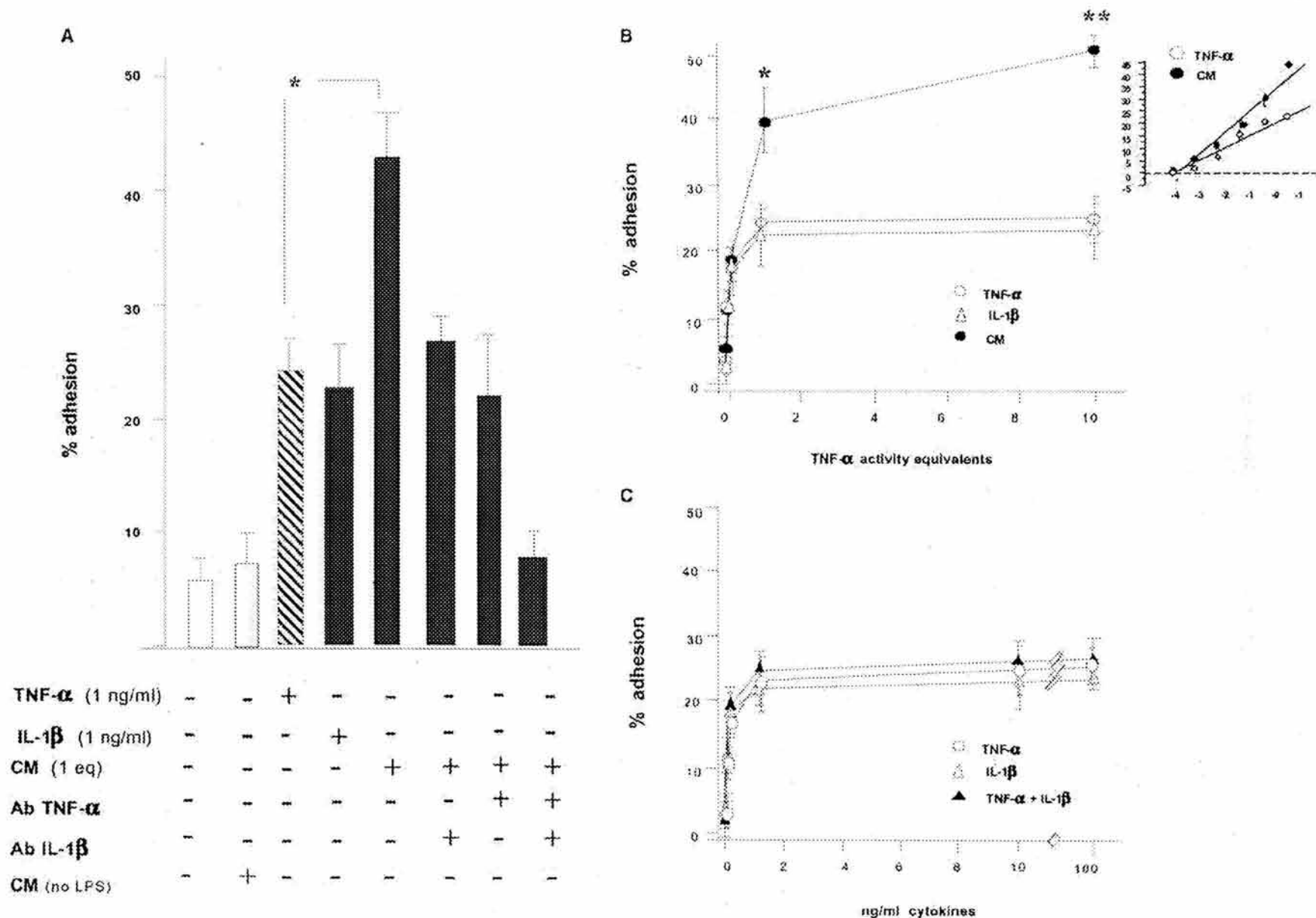
## Results

Preliminary experiments (data not shown), using both ELISA and cytotoxicity assays, corroborated the well-known fact that TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  production rises during the first 3 h and begins to decay 6 h post activation [17]. Moreover, under our working conditions 3 h after LPS activation, the content of IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  consistently attained an approximate 1:1 ratio; i.e.,  $1 \text{ ng/ml}$  of each cytokine. To mimic the natural mixture of products in the early inflammatory reaction, CM were collected 3 h after LPS addition. Therefore, the CM amount used in all experiments was minimally adjusted to provide the biological activity equivalent to  $1 \text{ ng/ml}$  of each recombinant cytokine. We have termed this protein amount as 1 eq. The calibration of the TNF- $\alpha$  content in all CM stocks was further confirmed using the cytotoxicity assay.

### CM increases the adhesion capacity of HUVEC as compared to recombinant cytokines

HUVEC adhesion response to human recombinant cytokines (TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$ ) and to CM is shown in Figure 1A. As expected both cytokines as well as the CM were able to induce HUVEC adhesion. CM, however, showed a significantly more robust level of adhesion than either cytokine alone ( $p < 0.05$ ). Thus, whereas the adhesion response elicited by  $10 \text{ ng/ml}$  of either TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  or their combination reached 23% ( $\pm 3$ ), 21% ( $\pm 2$ ) and 27% ( $\pm 4$ ) respectively, the response obtained by incubating with 1 eq CM was twofold ( $42\% \pm 4$ ). To evaluate the relative contribution of either TNF- $\alpha$  or IL- $1\beta$  in the response elicited by CM, the adhesion assay was performed with a CM previously treated with neutralizing antibodies against these cytokines. As shown in Figure 1A, adhesion was reduced from  $44\% (\pm 8)$  to  $26\% (\pm 3)$  using anti-TNF- $\alpha$ , and to  $24\% (\pm 6)$  with anti-IL- $1\beta$ . The simultaneous addition of both antibodies further reduced adhesion down to basal levels, showing that the response observed after CM stimulation critically depended on these two cytokines. In order to rule out any unspecific effect of the CM, we also tested the effect of CM from macrophage-like cells not treated with LPS. We confirmed independently that this control medium had no detectable levels of IL- $1\beta$  or TNF- $\alpha$  as measured by ELISA or cytotoxic assay. A further characterization showed that both recombinant cytokines and CM acted in a dosedependent manner (Fig. 1B). Recombinant cytokine reached saturation at a concentration of  $1 \text{ ng/ml}$ . In contrast, CM treatment consistently surpassed the saturation level of adhesion observed with recombinant cytokines. The differences in dependency to increasing concentrations of TNF- $\alpha$  or CM can be appreciated in figure 1B (inset), where log/log regressions showed a significant difference in the slope of the adhesion curves ( $p < 0.05$ ).

In order to determine whether the high levels of adhesion attained by CM could be the result of both cytokines acting additively, we analyzed the response of increasing doses of both recombinant factors added together. Figure 1C shows that the adhesion capacity induced by both cytokines also reached saturation at similar levels after a dose of  $1 \text{ ng/ml}$  of each.



**Fig. 1.** Conditioned Media (CM) increase the adhesion capacity in HUVEC above the saturation level reached by recombinant cytokines. **(A)** Adhesion assay in HUVEC stimulated with CM or recombinant cytokines. Note that CM-stimulated HUVEC showed a twofold percent of adhesion in compare with TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . The bars 6–8 shown adhesion induced by CM previously treated with neutralizing antibodies against TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  or both. The control CM no LPS correspond to CM from macrophages differentiated *in vitro* without LPS stimulation. **(B)** Adhesion assay with increasing doses of either TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or equivalent doses of CM (see Materials and methods), inset shows adhesion level against log of TNF- $\alpha$  concentrations. **(C)** Percent adhesion of U937 to HUVEC pre-stimulated with increasing doses of either TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or both. All the results are expressed as average percentage of cell adhesion  $\pm$  1 standard error of the mean (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.001$ ).



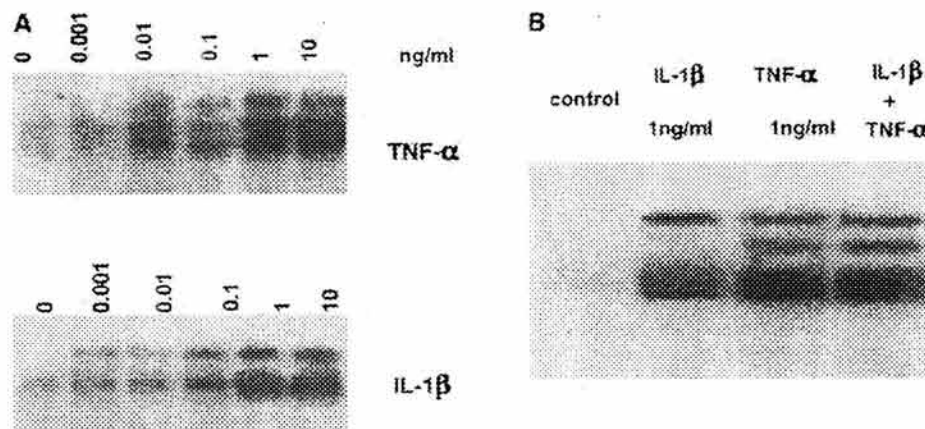
*CM promotes an increased and sustained NF- $\kappa$ B translocation in HUVEC*

As in the case of the adhesion response, nuclear NF- $\kappa$ B levels assessed by EMSA were dose-dependent and reached their highest value at 1 ng/ml of either TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . This level of translocation could not be further increased using higher doses (Fig. 2A). Furthermore, the simultaneous addition of both recombinant cytokines (1 ng/ml of each) had no additive effects (Fig. 2B). On the contrary, NF- $\kappa$ B CM-dependent translocation consistently reached a much higher level, exceeding the saturation point attained by recombinant cytokines (Fig. 3A). The quantity of NF- $\kappa$ B translocated in TNF- $\alpha$  and CM-treated cells was 3.1 and 7.4 times the con-

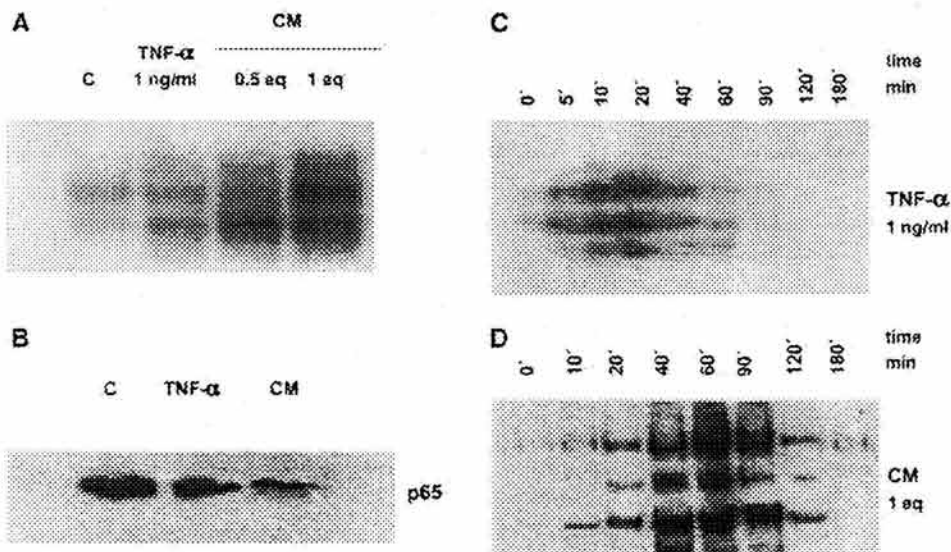
trol, respectively (Fig. 3A, lanes 2 and 4). Interestingly, TNF- $\alpha$  and CM-treated cells consistently exhibited three nuclear complexes, whereas only two of them were observed in the IL-1 $\beta$ -treated cells (In the following paragraphs of the discussion we named these complexes I, II and III in terms of their electrophoretic mobility).

Recombinant TNF- $\alpha$  induced a rapid and transient NF- $\kappa$ B translocation. The peak was reached at 20 min and returned to basal levels 60 min after treatment (Fig. 3C). In contrast, in CM-treated cells the response was sustained and reached its highest levels 60 min after stimulation (Fig. 3D).

As shown in Figure 3B the quantification (Western blot) of the cytoplasmic inactive pool of NF- $\kappa$ B revealed that



**Fig. 2.** Recombinant cytokines induce a dose-dependent NF- $\kappa$ B translocation EMSA for NF- $\kappa$ B in cytokines-treated HUVEC. (A) Dose-response NF- $\kappa$ B translocation with recombinant TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  (B) HUVEC pre-stimulated with 1ng/ml IL-1 $\beta$ , 1ng/ml TNF- $\alpha$  or 1ng/ml IL-1 $\beta$  plus 1ng/ml TNF- $\alpha$ . Nuclear extracts were collected 20 min after cytokine stimulation.



**Fig. 3.** CM induce increased and longer lasting NF- $\kappa$ B translocation in HUVEC. EMSA for NF- $\kappa$ B in cytokine or CM-treated HUVEC. (A) Translocation of NF- $\kappa$ B in HUVEC stimulated with 1ng/ml TNF- $\alpha$  or CM at 0.5 and 1eq (equivalent dose, see Materials and methods). Nuclear extracts were collected 20 min after stimulation. (B) Time course of NF- $\kappa$ B translocation in HUVEC treated with 1 ng/ml of TNF- $\alpha$ . (C) Time course of NF- $\kappa$ B translocation in CM-treated HUVEC. (D) Western Blot of the cytoplasmic fraction from HUVEC treated with TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) or CM (1 eq) during 20 min, using polyclonal antibody against the p65 NF- $\kappa$ B subunit.



TNF- $\alpha$  treatment leaves a larger remnant than CM treatment. In addition and despite its greater stimulatory effect, CM treatment was unable to exhaust this pool.

*CM-mediated effects are not explained by residual carry-over of LPS*

Even though CM preparation involves the removal of LPS, the participation of possible residues of this endotoxin had to be ruled out. Consequently, a series of experiments were conducted using polymyxin B (Pol B). This antibiotic specif-

ically binds and prevents the endotoxin to interact with its cell receptors, thus acting as a neutralizing agent against LPS-mediated activation [18]. To this end we decide to use a concentration of Pol B (1 mg/ml) which when added alone is devoid of significant effects but that effectively inhibits the adhesion response induced by 10  $\mu$ g/ml of LPS (Fig. 4A). In marked contrast, when this amount of Pol B was added to CM, the characteristic enhanced response to media was unaffected. Furthermore, the addition of LPS to CM does not potentiate its activity (Fig. 4A bar 8). This lack of effect of Pol B upon CM was confirmed by EMSA (Fig. 4B).

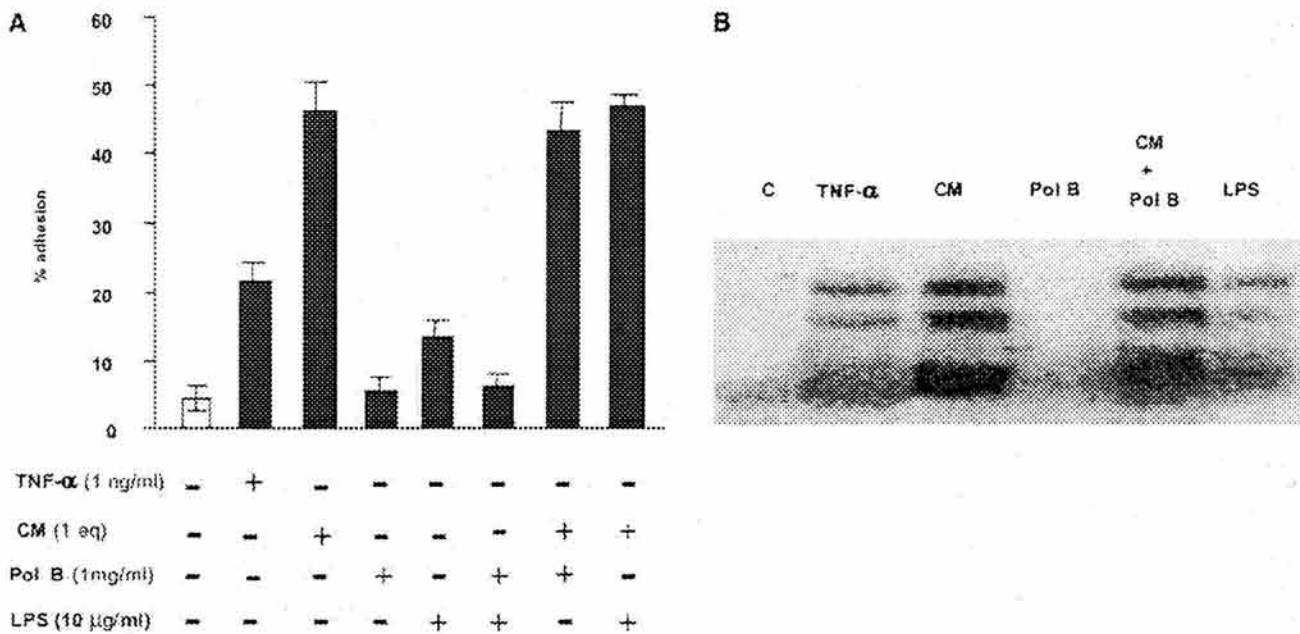


Fig. 4. LPS carry-over does not contribute to the enhancing effect of CM. (A) Percent adhesion in HUVEC after stimulation with CM previously treated with 1  $\mu$ g/ml of polymyxin B (Pol B), TNF- $\alpha$ , LPS or CM plus LPS. (B) EMSA in TNF- $\alpha$ -treated HUVEC (1ng/ml) or CM-treated HUVEC (1 eq, see Materials and methods). The CM was pre incubated with polymyxin B (1  $\mu$ g/ml) for 2 h at 37°C before stimulation. Note that the LPS concentration used in EMSA and adhesion assays (10  $\mu$ g/ml) was 100 times higher than the amount used for the activation of U937 cells (0.1  $\mu$ g/ml) Nuclear extracts were collected 20 min after stimulation.

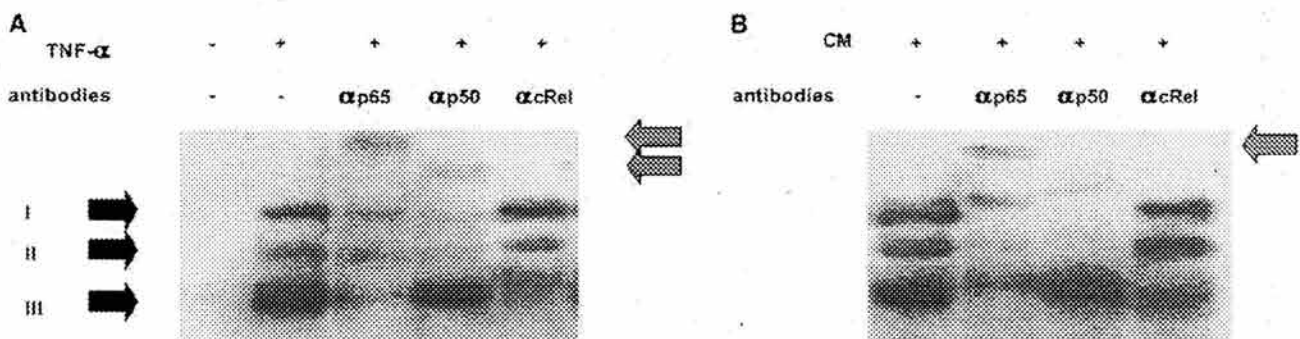


Fig. 5. Identical NF- $\kappa$ B subunit composition of the complexes translocated into the nuclei of HUVEC after TNF- $\alpha$  or CM treatment. EMSA in TNF- $\alpha$ -treated HUVEC (1 ng/ml) or CM-treated HUVEC (1 eq, see Materials and methods). Left side arrows show the different complexes (I, II and III respectively), right side arrows show the supershift complexes formed with the anti-p65, anti c-Rel and anti-p50 antibodies. Nuclear extracts were collected 20 min after stimulation.

*CM translocates the same NF- $\kappa$ B subunits to the nucleus as does TNF- $\alpha$*

To further explore the subunit composition of the translocated NF- $\kappa$ B complexes in response to CM, a *supershift* EMSA assay using antibodies against the different subunits was performed (Fig. 5). All these assays were performed 20 min after stimulation, which correspond to the peak of TNF- $\alpha$  induced activity. The mobility of the protein-DNA complexes from TNF- $\alpha$ - and CM-treated cells revealed that the three of them are heterodimers. The complexes I and II contain the p50 and p65 subunits, and complex III contains c-Rel and the p65 subunit.

*The  $\epsilon$  and  $\beta$  I $\kappa$ B isoforms degraded earlier in response to CM*

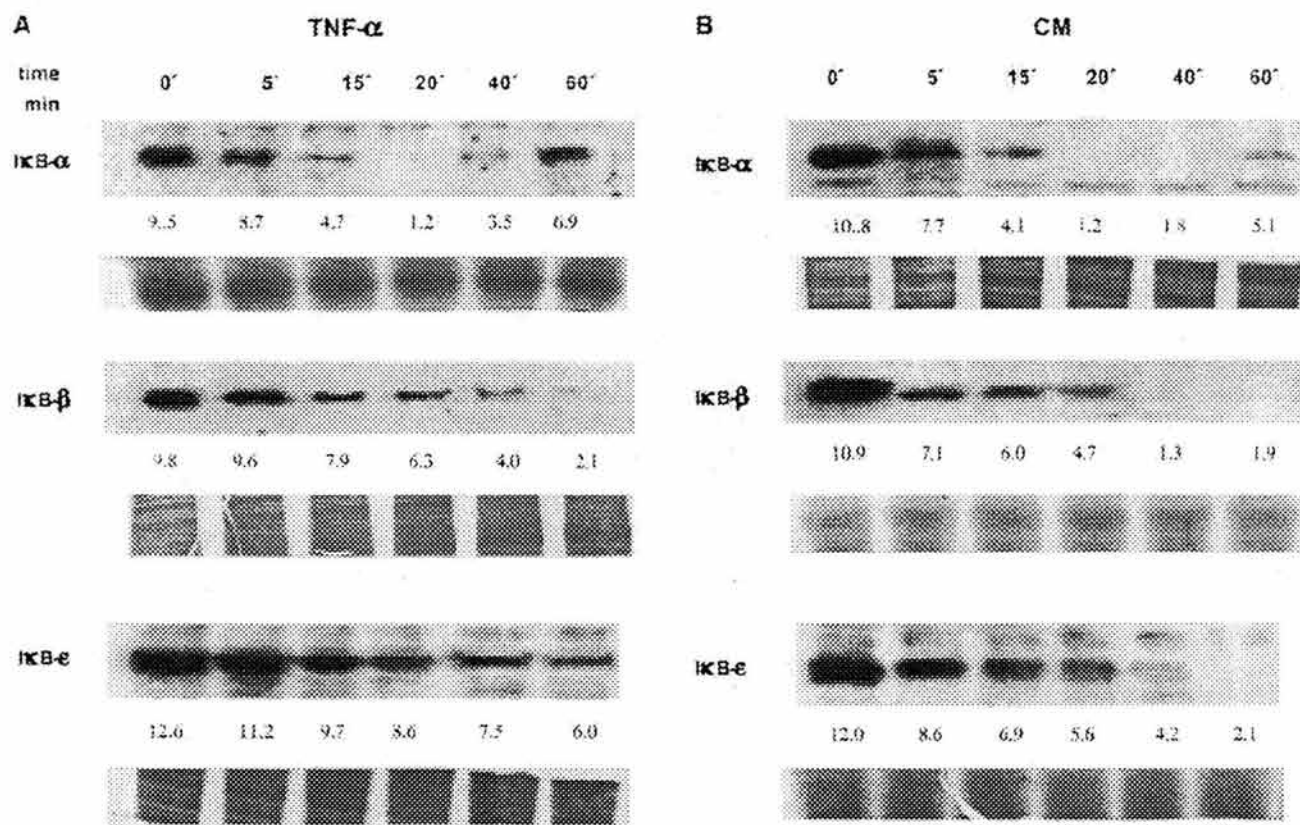
To further characterize the mechanism of NF- $\kappa$ B activation in CM-activated cells, we followed the degradation of I $\kappa$ B isoforms (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$ ) which are typically implicated in the NF- $\kappa$ B transduction pathways. Figure 6 shows a distinct degradation pattern depending on the activating stimuli. For TNF- $\alpha$  treated cells there is a rapid I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation which attains its maximum at 20 min, and is followed by a partial restitution 60 min after TNF- $\alpha$  stimulation. In

contrast, CM-stimulated cells degrade I $\kappa$ B- $\alpha$  in a sustained form, and the re-synthesis seems to be delayed. In the case of the other I $\kappa$ B's, TNF- $\alpha$  induces a similar but slower profile which exhibit a tandem pattern of degradation: I $\kappa$ B- $\beta$  followed by I $\kappa$ B- $\epsilon$ . Conversely, in CM-treated cells, these isoforms disappeared faster.

## Discussion

The present study offers a number of compelling observations supporting the view that the inflammatory potency of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  is increased in the physiological context of CM. Our data strongly support present views regarding the complex interplay of positive and negative signals to modulate the well-known role played by canonical cytokines in the trigger of the integrated inflammatory response [3, 19].

TNF- $\alpha$  is a widely recognized major mediator of the innate immune response [20]. However, since septic shock and other inflammation-related pathologies cannot be prevented solely by inhibiting TNF- $\alpha$  secretion and/or activity, the participation of other factors known to be secreted by macrophages can not be ruled out [1]. Furthermore, with the availability of recombinant cytokines most of the current *in vitro* studies have been aimed at dissecting the mechanisms, overlooking the physiological context of the inflammatory response.



**Fig. 6.** CM induce a faster sequence of degradation of the distinct I $\kappa$ B isoforms. Western blot of I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$  in the cytoplasmic fractions from TNF- $\alpha$  or CM-treated HUVEC. The cytoplasmic extracts from HUVEC were collected at the indicated time points. The non-transferred portion of every gel was stained with Coomassie blue and is shown in the lower part of the corresponding blot as a loading control. The values from densitometry analysis are shown.

This study is based in an experimental model that uses both CM from LPS-activated macrophage-like cells, and primary cultures of human endothelial cells. CM constitutes a classical model in the study of the inflammatory reaction. Furthermore, these media were the original source that allowed the identification and purification of TNF- $\alpha$ , among other classical inflammatory cytokines [21]. Since these media contain the physiological proportions of inflammatory mediators, they constitute a closer model to the *in vivo* response of endothelial cells to the natural array of inflammatory signals [22]. On the other hand, U937 cells have been widely used as an *in vitro* model for myeloid differentiation and activation. Furthermore, U937 cells are an excellent source of mature human macrophage-like cells since they express the typical myeloid markers after *in vitro* differentiation [23–26].

It is well documented that TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  pathways converge on the IKK kinase, an important upstream mediator of the NF- $\kappa$ B pathway [9, 27]. Our data further support the idea that NF- $\kappa$ B is a critical point of convergence in the signaling pathways activated by these two inflammatory cytokines. Removing both native TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from the CM abrogates their ability to activate endothelial cells, which is consistent with the concept that these two cytokines alone or in combination are critical for the inflammatory effects seen in our model. In addition, our results strongly suggest a modulatory effect elicited by factor(s) present in the CM that potentiate the TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  responses. Interestingly, these unrecognized factors showed no inflammatory activity by themselves. Actually their lack of activity on the HUVEC in the absence of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  is probably the reason why they haven't been detected.

A number of compelling observations in this study suggest that the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  activity can be modulated by the physiological inflammatory context.

A pattern of cytokine-induced saturation was observed in NF- $\kappa$ B translocation in response to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . A similar pattern of saturation was evident in the adhesion response and was reached at the same dose of recombinant cytokines (1 ng/ml). In contrast, CM, adjusted to contain TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in a concentration equivalent to the saturating dose, greatly surpassed the highest activation reached by recombinant TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  either separately or together. These results imply that the additional response is not simply the additive effect of both cytokines acting in concert, and that the mechanisms activated by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are affected by CM in such a way so that more NF- $\kappa$ B translocates into the nucleus.

CM not only causes a higher activation of NF- $\kappa$ B, but a longer lasting one. It is widely accepted that TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B translocation is transient, and that it decays due to the re-synthesis of the I $\kappa$ B proteins [28], and the resulting recapture of the active nuclear factor. Whether this extended duration of CM-mediated NF- $\kappa$ B translocation is the result of stabilization of the factor in the nucleus or due to the inhibition of I $\kappa$ B protein production remains to be determined. Interestingly, the additional NF- $\kappa$ B complexes do not show a different composition when compared with the ones recruited by TNF- $\alpha$  alone. This observation reinforces the idea that, with respect to NF- $\kappa$ B activation, the CM facilitates a TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ -dependent signaling pathway with an elevated capacity for recruitment of NF- $\kappa$ B.

We suggest that this enhancing effect of the CM does not correspond to an alternative mechanism, but results from a particular combination of mediators that provide with a more effective physiological signalling context. This view is supported by the fact that, when using TNF- $\alpha$  alone we still observed a significant amount of cytoplasmic p65 NF- $\kappa$ B isoform, but the amount of the cytoplasmic p65 NF- $\kappa$ B isoform falls to half after CM stimulation. This demonstrates the presence of an additional cytoplasmic NF- $\kappa$ B pool that can be recruited when TNF- $\alpha$  acts in the context of CM.

The kinetics of degradation and re-synthesis of the different I $\kappa$ B isoforms in response to TNF- $\alpha$  and CMs offer a possible explanation of the additional recruitment of the cytoplasmic NF- $\kappa$ B pools. Our results regarding their order of degradation are consistent with previous reports [29, 30], which show that I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$  disappear sequentially. However, our study suggests that the signal initiated by the CM could have a better access to the I $\kappa$ B degradation pathway than TNF- $\alpha$  alone, since the I $\kappa$ B- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\epsilon$  isoforms show a faster and more pronounced degradation in response to CM than to TNF- $\alpha$  alone. Our data also suggest that an NF- $\kappa$ B pool retained in the cytoplasm by these isoforms could be responsible for the sustained NF- $\kappa$ B translocation response (see above). CM-induced translocation of NF- $\kappa$ B could thus be the result of a sequential release of an additional source of NF- $\kappa$ B. Nevertheless, additional mechanisms like some form of NF- $\kappa$ B stabilization in the nucleus cannot be ruled out. Also in future studies, it will be of particular interest to elucidate the possible additional involvement of non-canonical NF- $\kappa$ B pathways [6, 27].

Additional results in our laboratory have shown a 167-fold increase in the expression of the adhesion molecule Selectin-E in response to CM, as measured by fluorescence in flow cytometry analysis. Although this response is higher than the expression obtained by employing saturating doses of TNF- $\alpha$  (120-fold), it does not completely account for the increased adhesion observed in the present study (Fig. 1). Since ICAM-1 regulation in HUVEC is mediated by the NF- $\kappa$ B subunits p65/c-Rel, which involves I $\kappa$ B- $\epsilon$  degradation [31], an increase in this molecule could help to explain the CM-mediated increased adhesion. The quantitation of ICAM-1 molecule will therefore be particularly important.

Since the blockade of either cytokine impairs the potentiating response, and the blockade of both totally inhibits it, the possibility of an independent adhesion signal pathway activated by some of the factors present in CM is very unlikely. The enhanced CM-mediated adhesion however, requires canonical cytokines, probably because the expression of ICAM-1 is also regulated by the sequential and cooperative expression of other adhesion molecules like E-Selectin and VCAM-1 [6]. A scenario where the CM context potentiates the effect of canonical cytokines, particularly over the I $\kappa$ B- $\epsilon$  degradation, could explain the critical participation of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the CM-mediated improvement in adhesion. Further analysis of adhesion molecules in CM-stimulated HUVEC should provide additional evidence of the mechanisms of potentiation of adhesion by CM.

The enhancing effect hereby reported could be mediated by several possible factors. Numerous reports show TNF- $\alpha$  modulation by other cytokines. IFN- $\gamma$  is the best known potentiator of a variety of responses triggered by TNF- $\alpha$ ,



such as NF- $\kappa$ B translocation and expression of adhesion molecules [32]. In our model, the simultaneous addition of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  to HUVEC could mimic the improvement observed in adhesion (41%  $\pm$  3 induced by the combination of IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$ , and 43%  $\pm$  4 induced by the CM). A similar effect was observed upon NF- $\kappa$ B translocation (data not shown). ELISA screenings, however, showed no detectable amounts of IFN- $\gamma$  in our CM stocks. The possible participation of other known molecules on the enhancing effect shown in this study remains to be determined.

The ability of the factors secreted by LPS-activated macrophage-like U937 cells to potentiate the TNF- $\alpha$ -mediated endothelial activation is likely to be biologically relevant, particularly in pathologically exacerbated responses of the immune system, such as septic shock [33–35]. A better understanding of the regulatory effect of the factors co-secreted with TNF- $\alpha$  could also redirect the interpretation of many *in vitro* studies using recombinant cytokines, thus adding to the understanding of the mechanism underlying pathological inflammatory states [36].

**Acknowledgements.** This work was supported by grants IN214900 (DGAPA, UNAM) and 400346-534878M (CONACyT). We acknowledge Dr. Laura Ongay, Guadalupe Codiz and Minerva Mora from the Unit of Molecular Biology at IFC. We thank the Toco-Quirgic, Enseñanza, and Genetic Units of the Hospital de la Mujer, especially Dr. Batres Masiel and Dra. Cardona Rodriguez. The authors thank Dr. Felix Recillas, Dr. Beutler, Dr. Jeziorski, Dra. Araxi Urrutia, Dr. Enrique Espinosa and specially Dr. Po for their critical review and useful advice.

## References

- [1] Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Bmj* 2003; 326: 262–6.
- [2] Zentella A, Manogue K, Cerami A. The role of cachectin/TNF and other cytokines in sepsis. *Prog Clin Biol Res* 1991; 367: 9–24.
- [3] Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846–52.
- [4] Ronald JA, Ionescu CV, Rogers KA, Sandig M. Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 601–9.
- [5] Yang, Domingos NCK, MWS. Identification of a Novel Family of Cell-surface Proteins Expressed in Human Vascular Endothelium. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 46364–73.
- [6] Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 317–25.
- [7] Colwell J. Pathogenesis of vascular disease. *Diabetes Obes Metab* 2000; 2 Suppl 2: S19–24.
- [8] Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors: structural views. *Oncogene* 1999; 18: 6845–52.
- [9] Senftleben U, Karin M. The IKK/NF- $\kappa$ B pathway. *Crit Care Med* 2002; 30: S18–S26.
- [10] Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. I $\kappa$ B $\beta$ , but not I $\kappa$ B $\alpha$ , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- $\kappa$ B dimers by masking both NF- $\kappa$ B nuclear localization sequences in resting cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 45225–35.
- [11] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81–96.
- [12] Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends Cell Biol* 2000; 10: 129–33.
- [13] Wu C, Ohmori Y, Bandyopadhyay S, Sen G, Hamilton T. Interferon-stimulated response element and NF- $\kappa$ B sites cooperate to regulate double-stranded RNA-induced transcription of the IP-10 gene. *J Interferon Res* 1994; 14: 357–63.
- [14] Jaffe EA, Nachmen RL, Becker GC, Minick CR. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745–56.
- [15] Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996; 156: 3435–42.
- [16] Kramer SM, Carver ME. Serum-free *in vitro* bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1986; 93: 201–6.
- [17] Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF- $\kappa$ B p50. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5678–89.
- [18] Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb J* 1991; 5: 2652–60.
- [19] Gupta S, Xia D, Jiang M, Lee S, Pernis AB. Signaling pathways mediated by the TNF- and cytokine-receptor families target a common cis-element of the IFN regulatory factor 1 promoter. *J Immunol* 1998; 161: 5997–6004.
- [20] Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17: 3261–70.
- [21] Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; 161: 984–95.
- [22] Ayala A, Chaudry IH. Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock* 1996; 6: S27–38.
- [23] Navarro S, Debili N, Bernaudin JF, Vainchenker W, Doly J. Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 1989; 142: 4339–45.
- [24] Pucillo CE, Colombatti A, Vitale M, Salzano S, Rossi G, Formisano S. Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology* 1993; 80: 248–52.
- [25] Cannistra SA RA, Spriggs DR, Herrmann F, Kufe D, Griffin JD. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes. *J Clin Invest* 1987; 79: 1720–8.
- [26] Strefford JC FN, Chaplin T, Neat MJ, Oliver RT, Young BD, Jones LK. The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 94: 9–14.
- [27] Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G et al. Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495–9.
- [28] Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649–83.
- [29] Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* 1997; 90: 373–83.
- [30] Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D. Mechanisms by which I $\kappa$ B proteins control NF- $\kappa$ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 49–54.
- [31] Spiecker M, Darius H, Liao JK. A functional role of I $\kappa$ B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 3316–22.
- [32] Cheshire JL, Baldwin AS Jr. Synergistic activation of NF- $\kappa$ B by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and de novo I $\kappa$ B $\beta$  degradation. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6746–54.
- [33] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138–50.
- [34] Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996; 24: 1072–8.
- [35] Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D et al. Role of NF- $\kappa$ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997; 100: 972–85.
- [36] Riedemann NC, Ward PA. Anti-inflammatory strategies for the treatment of sepsis. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 339–50.

## Abreviaturas y glosario:

aa aminoácido  
ANOVA, análisis de varianza  
AP-1, proteína activadora 1  
ATP, adenosine trifosfato  
ASB, albumina de suero bovino  
cAMP, AMP cíclico  
CCR, receptor C-C quimiocina  
cDNA, DNA complementario  
C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein  
CREB, cAMP response element binding protein  
CSF, factor estimulante de colonias  
CTL, linfocito T citotóxico  
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium  
DMSO, dimetil-sulfóxido  
DNA, ácido deoxyribonucleico  
DTT, dithiothreitol  
EDTA, acid ethylenediaminetetraacético  
EGTA, ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ester)-*N,N,N,N*-tetraacetic acid  
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay  
EMSA, electrophoretic mobility shift assay  
FACS, fluorescence-activated cell sorter  
FBS, suero fetal bovino  
G-CSF, CSF de granulocitos  
GM-CSF, granulocyte-macrophage CSF  
GPIb-IX- Glícoproteína plaquetaria perteneciente al complejo IX  
HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid  
HLA, human histocompatibility leukocyte antigens  
HUVEC, human umbilical vein endothelial cells  
ICAM, intercellular adhesion molecule  
IFN, interferon (e.g., IFN- $\gamma$ )  
Ig, inmunoglobulina  
I $\kappa$ B, inhibidor de NF- $\kappa$ B  
IL, interleucina (e.g., IL-2)  
kDa, kilodalton  
LPL, lipasa lipoprotéica  
LPS, lipopolisacárido  
M-CSF, macrophage CSF  
MEM, minimum essential medium  
mRNA, RNA mensajero  
NF, factor nuclear  
NFAT or NF-AT, nuclear factor of activated T cells  
NF- $\kappa$ B, factor nuclear  $\kappa$ B  
NO, óxido nítrico



OCT, octamer-binding factor  
PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis  
PBS, phosphate-buffered saline  
PCR, polymerase chain reaction  
PMA, phorbol myristate acetate  
PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride  
RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted  
RNA, acido ribonucleico  
SDS, sodium dodecyl sulfate  
TBS, Tris-buffered saline  
TGF, transforming growth factor  
TNF, factor de necrosis tumoral  
TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand  
Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane  
VCAM, vascular cell adhesion molecule