



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MODULACION DE LA PARTICIPACION DE LA
INMUNOFILINA FKBP38 EN LA APOPTOSIS DE CELULAS
PBMC INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

E S P I N O S A P E R E Z A R E L I



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

m344607



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Espínosa Pérez

Areli

FECHA: 27 - mayo - 05

FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Fernando García Tamayo
Vocal: Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz
Secretario: Prof. Gabriel Sandoval López
Primer suplente: Prof. Elena Zambrano Gonzáles
Segundo suplente: Prof. Enrique Moreno Sáenz


Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Farmacogenética, Unidad de investigación
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

Asesor del tema:


Mtro. Gabriel Sandoval López

Sustentante:


Espínosa Pérez Areli

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	6
II.- ANTECEDENTES	8
2.1 Glucocorticoides	8
2.1.1 Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRES)	12
2.1.2 Sitios medios de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE1/2s)	13
2.1.3 Elementos de respuesta negativa (nGRES)	14
2.1.4 Factores de transcripción a los que se unen directamente los GR y no a las secuencias GRE en el DNA.	14
2.1.5. Resistencia a Glucocorticoides	16
2.2 APOPTOSIS	17
2.2.1 Caspasas	19
2.2.2 Vía extrínseca, mecanismo mediado por receptores de muerte	20
2.2.3 Vía intrínseca	21
2.2.4. Familia Bcl-2	22
2.2.5. Apoptosis y el GR	26
2.2.6. Regulación de Bcl-2 debida a los glucocorticoides (GC)	27
2.3 INMUNOFILINAS	31
2.3.1.FKBP38	33

III.- OBJETIVO E HIPOTESIS	37
3.1 OBJETIVO	37
3.2 HIPOTESIS	37
IV.- METODOS Y TÉCNICAS	38
4.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)	38
4.2 CUENTA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)	38
4.3 CULTIVO CELULAR	39
4.4 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL	42
4.5 ENSAYO DE LA INTEGRIDAD DEL RNA	43
4.6 OBTENCIÓN DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) A PARTIR DE RNA TOTAL MEDIANTE RT-PCR	44
4.7 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR)	44
4.8 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTO DE LA REACCIÓN DE PCR	47
4.9 DETECCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVES DEL ANALISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE DNA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	47
V.- RESULTADOS	48
VI.- DISCUSIÓN	65
VII.- CONCLUSIONES	68
VIII BIBLIOGRAFIA	70
APENDICE DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.	77

I.-INTRODUCCIÓN

La apoptosis es uno de los principales procesos de muerte celular, que depende de ciertos factores tanto internos como externos a los que la célula se encuentra expuesta. La familia de proteínas Bcl-2 juega un papel muy importante en la toma de decisiones relacionadas con la muerte o sobrevivencia celular. Dada la complejidad de las interacciones que existen entre los miembros de esta familia así como su regulación es que aun quedan muchas preguntas por responder acerca de estas. Por ello es que en este trabajo nos interesamos en uno de los principales miembros de esta familia el cual lleva el nombre de la misma, la proteína Bcl-2. Esta proteína se caracteriza por ser antiapoptótica, pero los mecanismos por los cuales realiza esta función no están del todo claros. Recientemente se ha detectado la presencia de una molécula que al parecer dirige a la proteína Bcl-2 hacia la membrana mitocondrial externa, dicha molécula pertenece a la familia de las inmunofilinas y se le ha llamado FKBP38, la cual en el año 2003 ha comenzado a estudiarse con mayor detalle. Esta presenta una serie de características que la hacen diferente de las otras inmunofilinas. Su importancia es clara pues si esta molécula no acompaña a Bcl-2, esta última no puede anclarse a la membrana mitocondrial externa, impidiendo con ello que cumplan con su función antiapoptótica.

Una de las principales interacciones estudiadas en el campo de las inmunofilinas es la que se da con los glucocorticoides, ya que algunas de estas se encuentran asociadas al receptor de glucocorticoides y la funcionalidad de este receptor depende de estas asociaciones, pero aún no se conoce nada acerca su relación entre estos y la FKBP38.

Este trabajo es un estudio inicial para establecer vínculos que podrían suscitarse entre la expresión de la inmunofilina FKBP38 con la de la molécula antiapoptótica Bcl-2 en células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) y como esta expresión puede verse influenciada por la presencia de los glucocorticoides.

Se utiliza dexametasona y cortisol como glucocorticoides de estudio pues el primero ha sido muy utilizado como proapoptótico a altas concentraciones en líneas celulares y queremos ver una comparación de efectos por diferentes glucocorticoides. Preferimos de inicio trabajar con cultivo primario de mononucleares totales de sangre periférica para acercarnos al modelo fisiológico que posteriormente analizaremos comparándolo con líneas celulares linfoides que es motivo de otro estudio en marcha.

II.- ANTECEDENTES

2.1 GLUCOCORTICOIDES

La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides: los corticoesteroides (glucocorticoides y mineralocorticoides), que tienen una estructura base de 21 átomos de carbono y los andrógenos que poseen 19 (Fig. 1). Históricamente, los efectos de los corticoesteroides se describieron como glucocorticoides (reguladores del metabolismo de carbohidratos) y mineralocorticoides (reguladores del equilibrio de electrolitos). Los corticoesteroides suprarrenales difieren en sus actividades biológicas relativas. En los seres humanos, la hidrocortisona (cortisol) es el principal glucocorticoide, y la aldosterona el mineralocorticoide más importante.

Las acciones fisiológicas de los corticoesteroides son muchas y una gran parte de estas se conocen. Además tiene diversos efectos a nivel de metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; participan en la conservación del equilibrio de líquidos y electrolitos, y la preservación de la función normal de sistema cardiovascular, inmunitario, riñones, músculo estriado, así como los sistemas endocrino y nervioso.

Es sabido que los niveles de corticoesteroides se ven alterados en circunstancias tales como el estrés, producido por estímulos nocivos y factores ambientales [1]

La producción de los glucocorticoides (GC) es regulada por la hormona adrenocorticotrópica hipofisaria (ACTH), con una modalidad pulsátil y ritmo circadiano. Debido a que los GC son moléculas liposolubles, son absorbidos fácilmente en cualquier superficie cutánea o mucosa, normalmente circulan en sangre, en su mayor parte, unidos a proteínas, siendo que la fracción libre es la que difunde al interior de las células, ejerciendo de esta forma su acción. Si bien el mecanismo de difusión simple a través de la bicapa lipídica de la membrana es

el más aceptado dadas las características hidrofóbicas y al bajo peso molecular de estas, hay evidencias de que su ingreso a la célula está regulado a través de receptores de membrana distintos al clásico y bien descrito receptor esteroideo (GR), los cuales se acoplarían a proteínas G, y este mecanismo sería responsable de las acciones rápidas de estas hormonas, por ejemplo la inhibición de la secreción de ACTH hipofisaria [2].

El mecanismo más estudiado acerca de los efectos producidos por los GC esta relacionado con su unión al receptor de glucocorticoides (GR), que es un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la familia de los receptores nucleares dentro de la subfamilia de receptores esteroideos, que comprende siete miembros: el receptor de estrógenos α y β , los receptores relacionados de estrógenos 1 y 2, y los receptores para mineralocorticoides, andrógenos y progestágenos. Si bien hasta ahora se han detectado seis transcritos diferentes del GR que se muestran en la **Fig. 2** [1]

El GR se encuentra en forma inactiva en el citoplasma asociado con otras proteínas; entre las que se encuentran Hsp90, Hsp 70, Hsp 40, la co-chaperona p23 y las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 [3] y Cyp40. También se tiene evidencia de que diversas proteínas de señalización se encuentran asociadas con el GR citoplasmático incluyendo las Scr (proteína tirosina cinasa) y Raf-1 (una serina-treonina cinasa citoplasmática, que juega un papel importante en el crecimiento, proliferación y sobrevivencia celular) (**Fig. 3**).

Se ha establecido que las chaperonas son necesarias para prevenir tanto la translocación nuclear como la formación de agregados insolubles de GR [1]. Si bien el papel que juegan las otras chaperonas que conforman al complejo aun no es claro, se sabe que los dímeros de Hsp90 están relacionados con la producción de cambios conformacionales necesarios para dejar al descubierto la hendidura de enlace al esteroide con su receptor. Se ha encontrado que la inmunofilina FKBP52 participa potenciando la afinidad del receptor por los GC, también se ha

demostrado que junto con la dineína y la Hsp90 ayuda en la translocación del receptor de GR al núcleo una vez que este se ha unido a su ligando. La Hsp90 y la chaperona p23 han sido

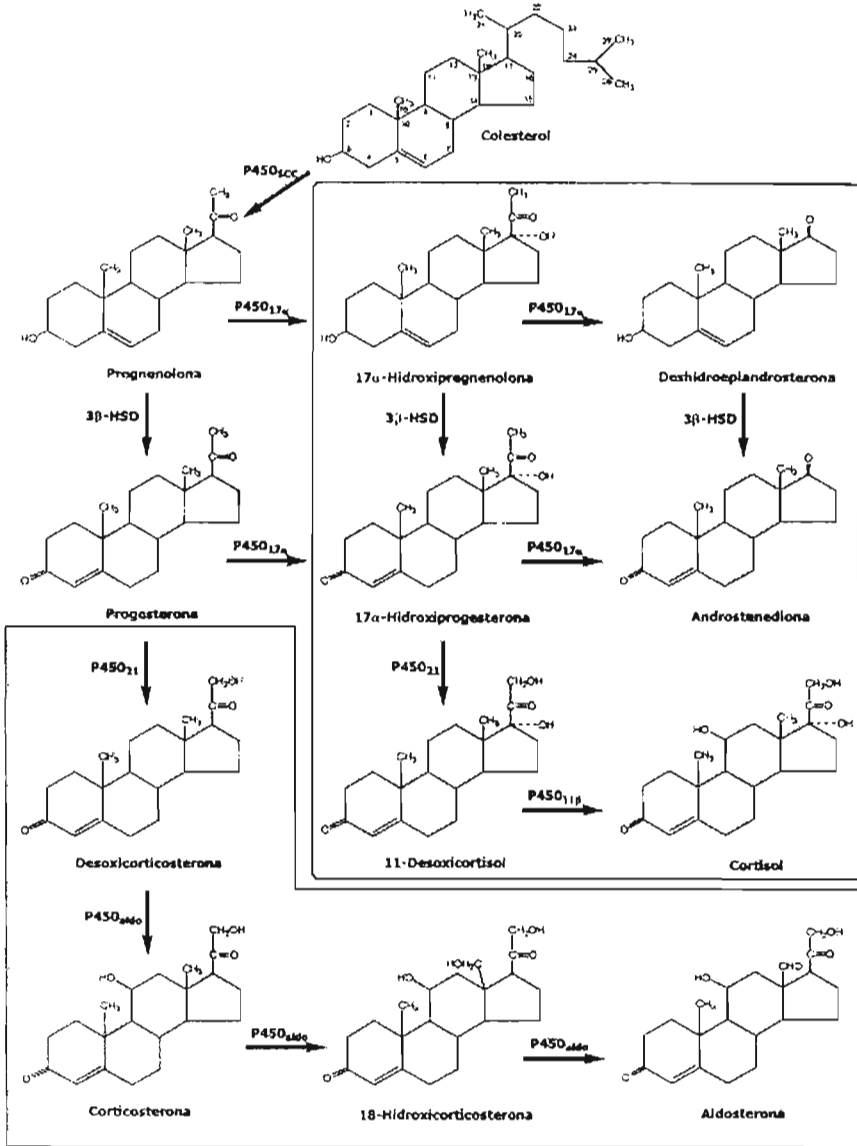


Figura 1. Vías de síntesis de los corticosteroides .Se muestran las vías esteroideogénicas usadas en la biosíntesis de los corticosteroides, junto con las estructuras de los intermediarios y productos.

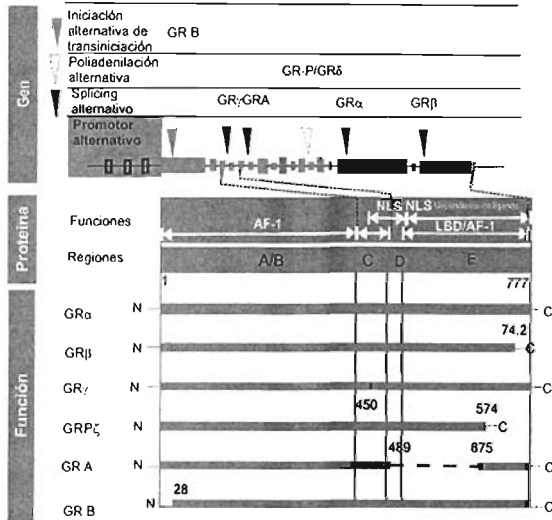


Figura 2. Genes del GR y las variantes hasta ahora conocidas. En el panel superior se tiene resumida la organización genómica del GR (NR3C1) en el cromosoma 5q31/32 y los mecanismos moleculares principales de las seis variantes de los transcritos del GR. Su estructura proteínica esquemática esta dada en el panel de abajo. El panel de en medio relaciona las estructuras intron/exon y las regiones de proteínas con su función asociada. a/b, c, d y e se refiere a las regiones proteínicas de los receptores nucleares, el número denota la posición de aminoácidos. AF son las secuencias implicadas en la transactivación, DBD dominio de unión a DNA, LBD dominio de unión a ligando, NLS secuencia de localización nuclear.

recientemente implicadas en la estabilización y desestabilización del enlace del GR al DNA [4, 5].

A diferencia de los otros receptores de esta superfamilia, la acumulación del GR en el núcleo es dependiente del enlace con su ligando (Fig. 3). Recientemente se ha sabido que el resultado de la unión de la hormona a su receptor produce cambios conformacionales en el GR que le permiten separarse de las proteínas de choque térmico que enmascaran a secuencias de localización nuclear (NLS2). Después de que se han separado de algunas proteínas de choque térmico el GR es translocado al núcleo, y es aquí donde puede interaccionar con regiones reguladoras de ciertos genes. Tenemos cuatro tipos de sitios de unión que pueden ser agrupados como sigue: 1) elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs); 2) sitios medios de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE1/2s) que están relacionados con la activación de la expresión de genes; 3) elementos de respuesta negativa (nGREs) que reprimen la expresión

genes y 4) factores de transcripción a los que se unen directamente los GR que no tiene que ver con su unión directa a las secuencias GRE en el DNA.

2.1.1 Elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs)

Los GR pueden activar la transcripción de genes por su enlace directo a los llamados elementos simples de respuesta a glucocorticoides (GREs) (Fig. 4 A). Basado en el número de GREs, una secuencia consenso de GRE ha sido definida como la secuencia palindrómica imperfecta pentadecamérica GCTACAnnnTGTTCT [6]. En contraste con los otros miembros de esta superfamilia de receptores, el GR se enlaza a estos GREs únicamente como un homodímero. El GR lleva a cabo la transcripción por el uso de las superficies de los dominios de transactivación como plataformas para el acoplamiento de coactivadores transcripcionales que son capaces tanto de alterar la cromatina local, hacer el reclutamiento de moléculas participantes y mantener la estabilidad de la maquinaria de transcripción (Fig. 3).

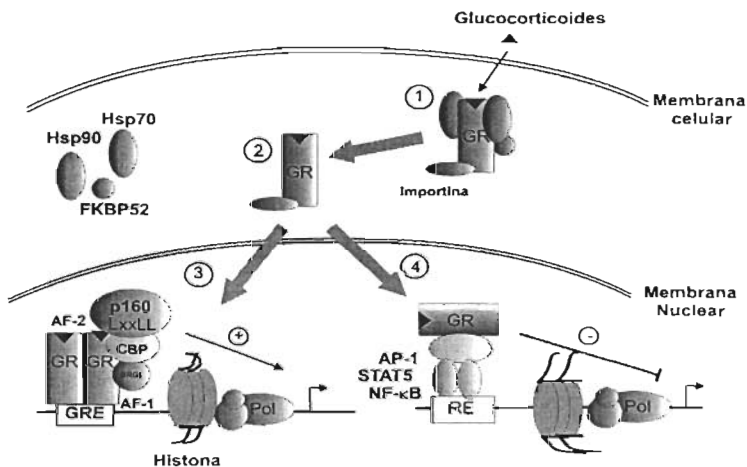


Figura 3. Acciones moleculares de los glucocorticoides. 1) Después de haber entrado a la célula, los GCs se enlazan al GR, el cual reside en el citoplasma formando un complejo con las chaperonas, y la inmunofilina FKBP52. 2) La unión del ligando induce la liberación de las chaperonas y la translocación de el GR al núcleo 3) La regulación de la expresión de los genes blanco en este caso es por contacto directo con el DNA, el receptor de glucocorticoides dimerizado se enlaza a los elementos de respuesta (GRE) y promueve la transcripción vía interacción con complejos de cromatina remodelada. Estos están comprometidos con CBP/p300 y los miembros de la familia histona acetilasa p160, la cual interactúa mediante los motivos LxxLL con el dominio activado por ligando AF-2 de el GR. 4) En esta forma monomérica, el ligando unido a su GR tiene interacciones cruzadas con factores de transcripción tales como AP-1 NFκ- B ya sea por interacción directa de proteína-proteína o mediante puentes de proteínas adicionales.

Si bien hay muchos genes que son regulados positivamente en respuesta a los GCs a través de los GREs , por ejemplo algunos de los que participan en la activación, funcionalidad y apoptosis de las células de sistema inmune tales como la fosfatasa MAPK-1, Bcl-X_L, IκBα (inhibidor de NFκB), GILZ(cierre de leucina inducido por glucocorticoides, el cual previene la activación de la transcripción mediada por NF-kB) , GTR (gen relacionado del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides) y IRF8 (factor 8 regulador de interferón) [7].

En un cierto número de genes, la respuesta a los GC no solo depende de la unión del GR al GRE, ya que adicionalmente se requiere que otros factores de transcripción estén unidos a sitios cercanos donde se localizan los GREs (**Fig. 4 A**).

2.1.2 Sitios medios de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE1/2s)

Por otro lado los GR también pueden unirse como monómero en algunos GRE, y estos son llamados entonces sitios medios de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE1/2s) [8]. Es probable que debido a su baja afinidad, el GR monomérico tiene dificultades para enlazarse a un GRE1/2s por sí solo y al parecer estas secuencias requieren elementos adicionales para mediar la respuesta a los glucocorticoides. Por otro lado también existen otros GRE1/2s que pueden actuar sin estos elementos accesorios mediante el uso de muchos GRE1/2s, por ejemplo el gen del citocromo del hígado humano P450 3A hCYP3A es regulado por dos GRE1/2s [9]. Los GRE1/2s tienen también la posibilidad de unirse a otros GREs. De cualquiera de las formas anteriores es como se logran interacciones cooperativas que quizá faciliten el enlace del GR monomérico junto con su actividad (**Fig 4B**).

2.1.3 Elementos de respuesta negativa (nGREs)

Estos elementos de respuesta negativa, actúan enlazándose directamente al GR sobre el nGRE (**Fig 4E**). Si bien la secuencia de reconocimiento es similar a la del GRE, pero esta presenta una mayor variabilidad (ATYACnnTnTGATCn) [10].

A pesar de que muchos nGRE han sido identificados, ninguno de ellos ha podido ser relacionado con la respuesta inflamatoria. Probablemente, por diferentes mecanismos que no requieren el enlace del GR a los GRE. Si bien la respuesta inflamatoria activa la transcripción de factores tales como factor nuclear kappa-B (NFκ-B) que se encuentra altamente asociado al proceso inflamatorio y AP-1 (esta proteína juega un papel importante en la expresión de muchos genes que tienen que ver con el ciclo y proliferación celular) que se enlazan directamente sobre sus elementos de respuesta en los genes blanco [11]. En la represión de estas respuestas por los GC no participa directamente el enlace del GR al DNA, ni en las secuencias nGREs, ni en los GREs. En el modelo de interacción directa, GR y AP-1 se enlazan por interacciones proteína-proteína y previenen el enlace con sus respectivos elementos de respuesta (**Fig. 4G y 5**).

2.1.4 Factores de transcripción a los que se unen directamente a los GR y no a las secuencias GRE en el DNA.

En ciertos genes, el GR no necesariamente tienen que estar unidos al DNA para llevar a cabo sus efectos, pero si es necesario que exista un factor de transcripción enlazado al DNA con el cual el GR pueda formar un complejo. Si bien aquí el GR parece comportarse como un corregulador inducible por ligando que emplea interacciones proteína-proteína para llevar a cabo sus efectos, lo interesante es que estos efectos pueden ser tanto negativos como positivos (**Fig 4 D y G**)

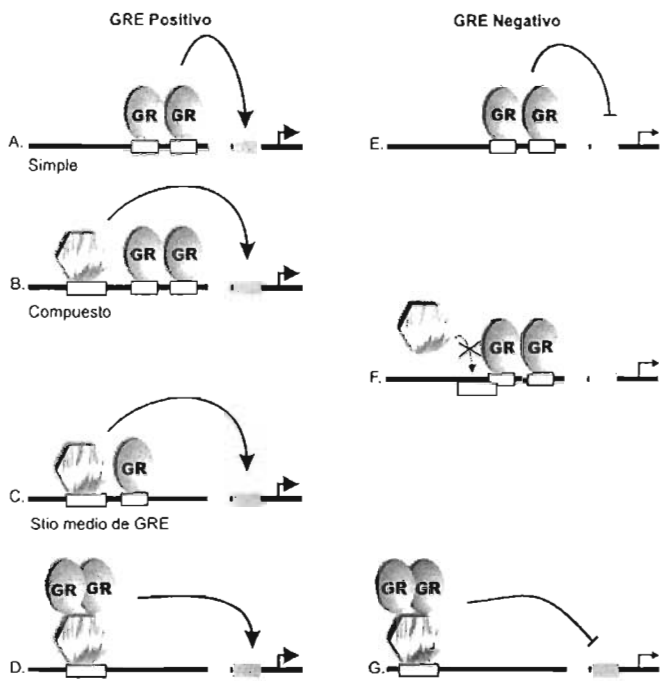


Figura 4. Mecanismos de interacción de GR con sus elementos regulatorios

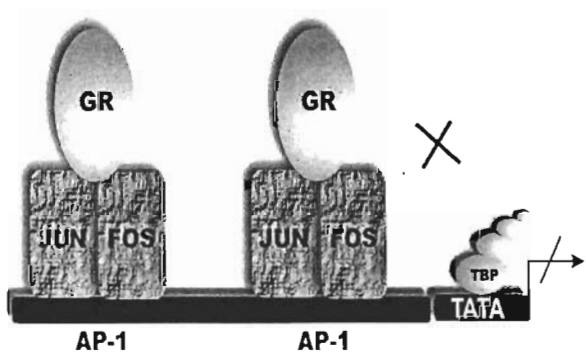


Figura 5. Regulación del gen de AP-1

2.1.5. Resistencia a Glucocorticoides

En términos generales la resistencia a los GC es definida como la incapacidad de una célula o de un tejido para responde a todos o a un cierto tipo de glucocorticoides. Esta resistencia puede ser absoluta como lo es en el caso en el que el receptor de glucocorticoides no esta presente. Por otra parte el manejo de las concentraciones de los glucocorticoides sobre las células, las puede llevar también a mostrar cierta resistencia.

Uno de los principales requisitos para que los GC actúen, es que se tengan adecuados niveles de GC intracelulares, ya que si bien esto es difícil de medir, lo que se hace es medir a los pacientes los niveles plasmáticos de cortisol, pero estas medidas no siempre son confiables porque los niveles plasmáticos de cortisol libre se ven alterados por la presencia de niveles altos de proteínas plasmáticas que se unen a esteroides, impidiendo que estos pasen al interior de la célula.

Una de las principales causas de la resistencia a los GC es la falta de este ligando que se debe a diferentes razones. Quizás intracelularmente los niveles de GC se reduzcan por la sobreexpresión de los miembros de la familia de los transportadores largos ABC, el más importante la P-glucoproteína y la proteína asociada a multirresistencia de fármacos (MPR), así como la proteína de resistencia de pulmón (LRP). Otro ejemplo de esto es la expresión de la enzima que metaboliza los GC en las células de osteosarcoma de ratas, la deshidrogenasa 11 β -hidroxiesteroide de tipo 2 que convierte el cortisol en cortisona que es inactiva [12].

Otro punto a considerar en la resistencia es el referido al mismo GR, ya que si bien ciertas mutaciones en el GR pueden ocasionar este fenómeno como en el caso de la línea celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL). Es un hecho que este es el principal mecanismo de resistencia in vivo, pero es también el que ha presentado mayor dificultad para resolverlo. La

combinación del tratamiento de GC con la quimioterapia en pacientes con algún tipo de cáncer puede llegar a ser contraproducente, ya que se propicia la mutación de estos receptores y su selección a favor de la célula cancerosa, lo que da como resultado una alta resistencia al GC. Sin embargo un estudio realizado en pacientes que padecían leucemia linfática y que eran sometidos a ambos tipos de tratamiento, no mostraron mutaciones en su DNA, ni en los sitios de unión a DNA para el GR [13]; otro estudio realizado en niños que padecían ALL mostraron una baja tasa de mutación en su GR asociada a la resistencia.

Otra razón para la resistencia a los GC podría estar asociada a ciertas variantes del receptor de glucocorticoides resultantes de un splicing alternativo (variante GR-A), como es el caso de una poliadenilación del receptor (GR-P). Por ejemplo GR-P/GR- γ y el GR-A fueron detectados en una línea de mieloma resistente a GC. La isoforma GR- α es al parecer la más funcional, y dado que esto es así se está estudiando su posible asociación a una alta sensibilidad a los GC. Lo que aún no se sabe es como es que estas variantes pueden producir dicha resistencia o en su defecto una alta sensibilidad a éstos [4].

2.2 APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso altamente conservado, el cual tiene una participación muy importante en la homeostasis y funcionalidad de todas las células, participando en el mantenimiento adecuado del número celular, así como en la remoción de las células que ya no son útiles al organismo. En el caso de las células del sistema inmune la apoptosis es muy importante en la maduración intratímica, en la activación, diferenciación, y proliferación de los linfocitos. Los análisis de la microscopía electrónica nos han permitido detectar ciertos cambios morfológicos en las células ocurridos durante la apoptosis, por ejemplo: condensación de la cromatina, encogimiento citoplasmático, y la formación de burbujas por parte

de la membrana plasmática. También se ha detectado que en las primeras fases del proceso, no se tienen cambios visibles en la mitocondria, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Sin embargo, algunos investigadores han reportado recientemente que la membrana mitocondrial externa se hincha y de esta forma es liberado el citocromo *c* [14] junto con el factor inductor de apoptosis y una flavoproteína relacionada con la oxido-reductasa del espacio intermembranal de la mitocondria. Se han propuesto varios modelos competentes para explicar cómo estos eventos podrían estar envueltos en la regulación de la apoptosis.

Los cambios moleculares ocurridos en la apoptosis incluyen la división internucleosomal del DNA, y la redistribución de la fosfatidilserina (PS) desde la parte interna de la membrana plasmática hacia la externa [15].

Existen dos vías generales por las cuales se puede desencadenar la apoptosis, una que esta mediada por los receptores de muerte o llamada vía *extrínseca* y otro por la liberación del citocromo *c* o vía *intrínseca*, en ambas vías existe la participación de caspasas (Fig. 6).

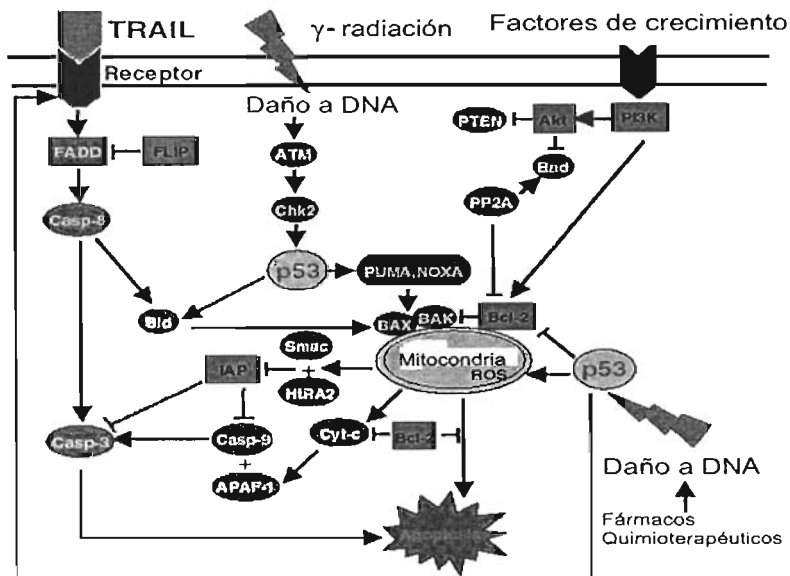


Figura 6. Diversos mecanismos de apoptosis

2.2.1 Caspasas

Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína y son esenciales para el desencadenamiento de la apoptosis. Al menos se han identificado alrededor de 14 caspasas en los mamíferos. Estas enzimas reconocen secuencias de tetrapéptidos y escinden sus sustratos sobre la parte carboxilo de un residuo de aspartato. Individualmente las caspasas tienen sustratos específicos que son determinados por el patrón de aminoácidos que están río arriba del sitio de corte (las posiciones P2-P4). Las caspasas son sintetizadas como zimógenos las cuales tienen intrínsecamente baja actividad enzimática. Si bien su actividad enzimática completa se da al conformar heterotetrámeros compuestos de dos subunidades idénticas de aproximadamente 20 kDa además de dos subunidades idénticas de aproximadamente 10 kDa. Estas subunidades pueden ser producidas por el corte de otras caspasas. Se tiene evidencia que sugiere que la agregación de al menos algunas caspasas como zimógenos es suficiente para promover el autoprocesamiento y la subsiguiente cascada de activación de caspasas. Si bien son llamadas las iniciadoras de caspasas a las que comienzan esta cascada de activación, por ejemplo la caspasa 8 y 9, que si bien son necesarias para la activación de las caspasas efectoras.

Algunas caspasas, particularmente las caspasa efectoras, son capaces de inactivar ciertas proteínas celulares vitales mediante escisión, tales como las enzimas reparadoras del DNA, laminita, gelsolina, MDM2 (un inhibidor de p53) y la proteína cinasa C δ . Existen enzimas que pueden ser activadas directa o indirectamente por la proteólisis mediada por caspasa. Como por ejemplo la caspasa 3 que puede remover ciertos dominios regulatorios negativos de la cinasa p21 que activa a la proteína cinasa 2, y es a través de este mecanismo como se da la formación de vesículas a partir de la de la membrana plasmática. La DNasa activada por caspasas (CAD) esta normalmente inactivada por el enlace de su inhibidor iCAD (también llamado factor de fragmentación del DNA (DFF)), y durante la apoptosis el iCAD es escindido por las caspasas

quedando entonces la endonucleasa activa, la cual produce los característicos cortes del DNA de las llamadas escaleras de apoptosis en los geles de agarosa [16].

2.2.2 Vía extrínseca, mecanismo mediado por receptores de muerte

Esta vía es iniciada por la unión de un ligando con su receptor y la subsecuente activación de ciertos mecanismos que culminan con el suicidio celular. La mayoría de estos receptores pertenecen a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R), que si bien dependiendo del tipo celular y de otras señales que la célula reciba estos receptores pueden desencadenar tanto proliferación, sobrevivencia, diferenciación y en su caso la muerte [17]. CD95 (también llamado APO-1 o Fas) y TNF-R1 son miembros de esta familia y contienen regiones citoplasmáticas denominadas “dead domains” (DD), las cuales son esenciales para la inducción de la apoptosis, y son estos dos a los que esencialmente se les ha llamado receptores de muerte. También han sido estudiados otros receptores de esta misma familia junto con sus ligandos, como TRAIL/APO2L (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF o ligando APO2) que induce apoptosis en células preferencialmente transformadas, y en contraste con otros ligandos que inducen muerte, éste es expresado en una gran variedad de tejidos. Si bien han sido identificados otros cuatro receptores para TRAIL/APO-2L (designados como DR4, DR5, DcR1 y DcR2 o TRAIL-R1 AL TRAIL-R4), pero solo DR4 y DR5 contienen los dominios DD que pueden desencadenar la apoptosis [74-78].

La oligomerización de Fas resulta en un reclutamiento del adaptador de proteínas FADD (dominio de muerte asociado a Fas), el cual contiene dos dominios efectores de muerte, que tienen la capacidad de unirse a la caspasa-8. El reclutamiento de múltiples moléculas de caspasa 8 es denominado como complejo de señalización inductor de muerte (DISC) el cual facilita su autoproteccionamiento y la formación de la enzima activa caspasa 8. En las células de tipo I (células mueren por la unión del ligando a Fas (CD95) sin intervención de la mitocondria), en las cuales se encuentran incluidos la mayoría de los linfocitos, en ellas resulta en la fragmentación y el

reclutamiento de la caspasa-3 y esto es suficiente para matar a la célula. Este mecanismo de apoptosis es diferente al que tienen las células de tipo II, tales como los hepatocitos, que requieren de un circuito de amplificación para obtener una respuesta lo suficientemente fuerte para desencadenar la muerte [18]. Este circuito de amplificación involucra a la mitocondria en la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, teniendo como resultado que estas células tipo II son resistentes a la señalización por Fas. A pesar de que los detalles aún no han sido aclarados del todo, parece ser que la caspasa-8 escinde al único miembro citosólico de la familia de BH-3, Bid. Después de los cortes realizados a Bid los fragmentos de éste migran hacia la mitocondria donde promueven la oligomerización de Bax y Bak. Lo que lleva a la desestabilización de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-3.

Independientemente de si las señales del receptor de muerte son mediadas a través del circuito de amplificación mitocondrial o no, estos convergen en la activación de la caspasa-3, la cual es considerada como un punto en el que ya no es posible regresar el proceso de muerte celular. A pesar de que las caspasas han sido consideradas como indispensables para la iniciación de la apoptosis existe evidencia que demuestra hay vías alternas que pueden prescindir de ellas [19], por ejemplo las proteínas mitocondriales AIF (factor inductor de apoptosis) y la translocación al núcleo de la endonucleasa G seguida de ciertos estímulos apoptóticos, donde ellos inician la degradación del DNA cromosomal sin requerir de la actividad de las caspasas.

2.2.3 Vía intrínseca

Los estímulos para que se lleve a cabo la activación de la vía intrínseca, tales como el daño a DNA, inician el proceso de apoptosis por alteración del delicado balance de las proteínas de la familia de Bcl-2, las cuales controlan la integridad de la membrana mitocondrial externa [20].

El mediador apoptótico mejor caracterizado es el citocromo *c*, el cual forma un complejo citosólico llamado “apoptosoma”, que consta del factor de activación de proteasas de la apoptosis 1 (Apaf-1) y la procaspasa 9. La formación del apoptosoma facilita el procesamiento de la procaspasa 9, que inicia el proceso de activación de las caspasas efectoras, siendo la más importante la caspasa 3. La desestabilización mitocondrial también da como resultado la liberación de proteínas que se enlazan y antagonizan a los miembros de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) denominada comúnmente SMAC /Diablo.

2.2.4. Familia Bcl-2

La familia de Bcl-2 (células B de leucemia/ linfoma 2 como proteínas) quienes modulan principalmente los eventos apoptóticos de mitocondria, se ha dividido en tres clases sobre la base de sus funciones y el número de dominios de homología con Bcl-2 (BH); así tenemos a los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-x_L que poseen cuatro dominios BH (BH1 a BH4); los miembros propapoptóticos Bak y Bax que tienen tres dominios BH (BH1 a BH3), y los miembros proapoptóticos de BH-3, entre los que están Bid, Bim que muestra homología solo con el dominio BH3 (Fig.7) [21]. Estos tres grupos son capaces de formar tanto homooligómeros como heterodímeros y de su asociación depende la permeabilización de la membrana mitocondrial. Bax y Bak pueden cada uno de ellos formar homo-oligómeros en la membrana mitocondrial externa en respuesta a señales apoptóticas, y alterar así la permeabilización de la membrana; de hecho las células que son doblemente deficientes para estas proteínas muestran gran resistencia a la liberación del citocromo *c* así como a la apoptosis inducida por múltiples estímulos [22, 23] Por el contrario, las células deficientes de proteínas de BH3 son resistentes a la liberación del citocromo *c* o a la muerte inducida por señales selectivas de muerte [24, 25]. La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x_L puede bloquear la permeabilización de

la membrana mitocondrial inducida por el aumento en la expresión de BH-3 o por Bax y/o Bak [26] Estas observaciones sugieren que las interacciones con las diferentes clases de proteínas de la familia Bcl-2, son cruciales para la determinación de las decisiones en la mitocondrial. Actualmente se ha aceptado que distintos estímulos apoptóticos convergen primero sobre diferentes proteínas del grupo de BH3, las cuales desencadenan señales para que la mitocondria decida entre Bax/Bak o Bcl-2/Bcl_{xL}

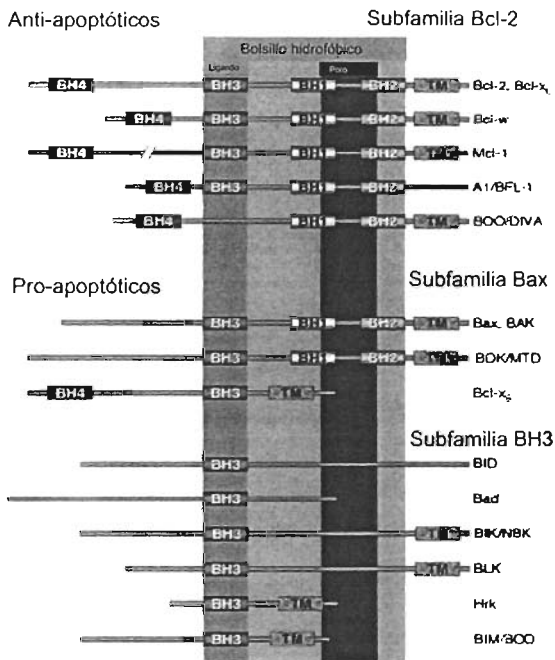


Figura 7. Clasificación y organización de los miembros de la familia de Bcl-2. BH, homología con Bcl-2, TM, transmembrana

Las proteínas de BH3-solo son activadas típicamente tanto por modificaciones post-transcripcionales tales como la activación de BID mediado por caspasa 8, Bid truncado (tBid), o por regulación positiva transcripcional.

En células normales, Bak se encuentra en forma inactiva, como monómero en la membrana mitocondrial externa en asociación con canales aniónicos dependientes de voltaje

(VDAC-2) [27], mientras que Bax quizás permanece inactivo en el citosol a través de interacciones con varias proteínas, incluyendo Ku-70 [28] y el péptido humanina (HN que es un péptido antiapoptótico de 24 aminoácidos codificado en el genoma de los mamíferos, que previene la translocación de Bax del citosol a la mitocondria) [29]. Muchas señales apoptóticas pueden desencadenar la translocación de Bax mediante las proteínas BH3, seguido por su inserción dentro de la membrana mitocondrial externa [30] y la formación de Bak o Bax homooligómeros, los cuales son probablemente los conductos de salida en la membrana mitocondrial externa para las proteínas apoptóticas del espacio intermembranal. Se han propuesto varios modelos para saber cómo las proteínas antiapoptóticas antagonizan las funciones de Bax, Bak y las proteínas de BH3. Cheng *et al*, han reportado que la capacidad de Bcl-2 y Bcl-x_L para inhibir la apoptosis inducida por la expresión correlacionada de Bid, Bim, o Bad tiene que ver con sus habilidades para enlazarse con las proteínas BH3 pero no así con Bax/ Bak [31]. Esta observación sugiere que las proteínas apoptóticas Bcl-2 quizás actúan a través del secuestro de proteínas activas BH3 a distancia de Bax/ Bak. Sin embargo el aumento de la asociación entre Bcl-2 y Bak se observa después del enlace entre Bid con Bak [34, 32], sugiriendo que quizás Bcl-2 tiene una función directa en la regulación de la oligomerización de Bak o Bax. Además la topología de la membrana mitocondrial se altera durante la apoptosis, reflejando un cambio conformacional potencial de Bcl-2 en respuesta al complejo activado de Bak/ Bax [33]. Entonces las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2 quizá funcionen en el secuestro de las proteínas activas de BH3 o por la restricción de la oligomerización de Bax/Bak, lo anterior contribuye en la generación de un ambiente no apto para que se desencadene la muerte celular. Si bien durante la apoptosis, la actividad antiapoptótica de Bcl-2 es superada probablemente de forma simultánea por la activación de distintas clases de proteínas de BH3, algunas de las cuales se enlazan e inactivan a Bcl-2, y este ambiente activador de proteínas BH3 es capaz entonces de activar a Bax/ Bak [34].

Un modelo simple para la permeabilización de la membrana mitocondrial, es mediante la inducción de un cambio conformacional alostérico en Bax/Bak por las proteínas de BH3, desencadenando su oligomerización y formándose poros en la membrana mitocondrial externa, además Newmayer y colegas han encontrado que Bid y Bax (o la oligomerización de Bax) podría formar poros en liposomas reconstruidos, permitiendo el paso de dextranos de dos MDa [35]. Es de interés que la formación de estos poros es absolutamente dependiente de la presencia de cardiolipina, que es un lípido enriquecido de la membrana mitocondrial interna, y en los sitios donde tienen contacto la membrana mitocondrial interna con la externa [36].

Diversos estudios muestran evidencia que sugiere que la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial debida a Bcl-2 va mas allá de las perforaciones generadas por Bak/Bax en la membrana mitocondrial interna que permiten que las proteínas del espacio intermembranal salgan. En primer lugar los perfiles de liberación de las diferentes proteínas del espacio intermembranal varían en sus ritmos y dependen de otros factores tales como las caspasas, sugiriendo que aquí hay puntos de regulación río arriba que deben de satisfacerse antes de que sean liberadas las proteínas del espacio intermembranal. En segundo lugar, la mitocondria parece sufrir varios cambios en la estructura y morfología de su membrana antes de la liberación del citocromo *c*, incluyendo la fusión mitocondrial [37] y la remodelación de las crestas de la membrana mitocondrial interna [38, 39] y la peroxidación lipídica [40]; todos estos cambios dan como resultado la liberación del citocromo *c*. En tercer lugar numerosos estudios indican que, en la permeabilidad mitocondrial, las aperturas pasajeras del poro de transición (mtPTP), y en gran medida la alta conductancia de complejos multiproteínicos que cruzan la membrana mitocondrial interna y la externa, son importantes para la liberación del citocromo *c* [41, 42, 43]. Y en cuarto lugar tenemos que en la familia de proteínas Bcl-2 Bax, Bak y Bcl-2 también se encuentran localizados en el retículo endoplasmático y pueden afectar la homeostasis del Ca^{2+} y la ingesta del mismo en la mitocondria, lo cual puede ser importante

para la apertura de mtPTP y la liberación de las proteínas del espacio intermembranal en algunos casos [44, 45, 46, 47]. Algunos de estos fenómenos pueden ser explicados por interacciones que han sido observadas entre proteínas de la familia Bcl-2 y componentes de mtPTP o la fusión de la maquinaria mitocondrial [48]. Si bien también es posible que Bax y Bak cooperen con el mtPTP para formar un canal en la membrana mitocondrial externa que puede ser inhibido por Bcl-2 [50]. Entonces las proteínas de la familia de Bcl-2 quizás activen en numerosos procesos en la mitocondria y el retículo endoplásmico durante la apoptosis, incluyendo la reorganización de proteínas apoptogénicas que están en el espacio intermembranal antes de que salgan a través de la membrana mitocondrial externa.

2.2.5. Apoptosis y el GR

Desde la década pasada ha sido del conocimiento general que los GC inducen la apoptosis en la mayoría de las células nucleadas del sistema vascular, tales como los timocitos, células de mieloma, así como los monocitos de sangre periférica entre otros [49]. Se ha reportado que los GC regulan el proceso apoptótico en varios tipos celulares a través del GR.

Por ejemplo en un estudio realizado en linfocitos de humano y de rata se demostró que uno de los principales efectos de la dexametasona sobre estas células fue el arrestamiento del ciclo celular, la condensación de la cromatina, encogimiento celular y la degradación selectiva del RNA y DNA. Se encontró que estos efectos eran dependientes de la presencia de los receptores funcionales [50].

Por otra parte la activación del GR involucra la fosforilación de residuos de serina, lo cual incrementa su potencia, pero decrece su tiempo de vida media. Sin embargo la correlación entre la fosforilación del receptor y la modulación de la apoptosis no ha sido del todo establecida [50].

Se ha estado estudiando acerca de las alteraciones del potencial de membrana inducidas por los GC, lo cual al parecer también modifica la expresión de ciertos genes, sugiriendo que este sea un nuevo mecanismo en la inducción de la apoptosis inducida por los GC [51].

2.2.6. Regulación de Bcl-2 debida a los glucocorticoides (GC)

Diversas investigaciones han reportado la capacidad de los GC para regular la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 y participar en la modulación de la apoptosis. Lo que permanece sin ser esclarecido es por qué en un tipo de células los GCs pueden inducir la apoptosis mientras que en otros tipos celulares tienen un efecto totalmente contrario a este. Una posible explicación a ello son quizás los diversos patrones de comoduladores que existen en cada célula en particular y que pueden afectar a los promotores de la familia de Bcl-2 de formas opuestas.

Los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-x_L) bloquean la apoptosis inducida por los glucocorticoides en varias líneas celulares, como por ejemplo la sobreexpresión de Bcl-2 en linfocitos pre-B humanos, y células MM se ven protegidas del efecto apoptótico inducido por glucocorticoides. La transfección de líneas celulares linfoides murinas S49.1 y WEHI 7.2 con Bcl-2 [52] y las células PC12 con Bcl-x_L [53], mostraron una alta resistencia a la fragmentación del DNA inducida por glucocorticoides. En contraste, los ratones que son knockout para Bcl-2 mostraron una respuesta apoptótica acelerada inducida por dexametasona. [54]

Así mismo se ha reportado que los GC promueven la apoptosis en los timocitos a través de la inducción de la expresión de proteína proapoptótica Bad que pertenece también a la familia de Bcl-2 [55], o a través de la disminución en la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L en las células leucémicas [56]. La supresión de los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 debida a los GC y la eliminación de la apoptosis inducida

por los GC al sobreexpresar la proteína Bcl-2 sugiere una relación causal entre la apoptosis inducida por los GC y las proteínas de la familia de Bcl-2, las cuales quizás tienen como prerrequisito la generación de peróxido de hidrógeno [57] o el transporte alterado de la membrana.

De acuerdo con lo anterior los GC parecen regular de diferente manera la expresión de las proteínas de Bcl-2 y los eventos apoptóticos dependiendo del tipo celular y la estimulación que se les de.

Por otro lado se ha demostrado en monocitos de sangre periférica que CD95 y el ligando de CD95 eran regulados positivamente por diferentes concentraciones de GC dependientes de tiempo, así como el incremento en su liberación hacia la membrana celular. En un ensayo paralelo la coestimulación con el antagonista del receptor de GC, el RU486, disminuyó la apoptosis que se estaba generando por la expresión de CD95/CD95L inducida por GC, subsecuentemente los niveles de caspasa 8 y caspasa 3 también descendieron. En este mismo ensayo la apoptosis se vio inhibida por la presencia del anticuerpo anti-CD95L. Todo lo anterior sugiere a los autores el hecho de que los GC inducen la apoptosis de los monocitos por una vía que se encuentra relacionada con CD95/CD95L [58, 59].

Por otra parte se encontró una asociación entre la muerte de las células T inducida inmediatamente después de un tratamiento con dexametasona, encontrándose con la activación de las caspasas 3,8, y 9. Basados en estudios con ratones que no expresaban los genes para Bid y Bax, estos no parecieron necesitar de estas moléculas proapoptóticas para que la dexametasona indujese la apoptosis de sus timocitos [60, 61], sin embargo otros reportes muestran que Bax es una molécula esencial para la inducción de la apoptosis de estos timocitos por dexametasona.[62, 63]

En si parece ser que los GC inducen la apoptosis actuando a diferentes niveles dirigiéndose en última instancia a la activación del sistema de las caspasas. Por ejemplo la dexametasona potencia la expresión de la molécula Bim (BimEL, BimL, y BimS) la cual facilita la translocación de Bax en la membrana mitocondrial y su unión con Bak, para así activar a la caspasa 9 [64]. Los glucocorticoides también pueden actuar por la liberación del segundo activador mitocondrial de las caspasas, Smac, quien activará a la caspasa 9. [65] También los GC pueden actuar alterando el potencial de membrana, lo cual también va a desencadenar la activación de las caspasas, de acuerdo con lo anterior al sobreexpresar a Bcl-2, ésta antagoniza la pérdida del potencial de membrana inducida por el GC, resultando también en una disminución de las especies reactivas de oxígeno en la línea de células pre-B de leucemia 697 [66].

Además, la relación de Bcl-2 con la apoptosis inducida por los GC parece estar a nivel de ciclo celular y sus reguladores, ya que la sobreexpresión de Bcl-2 retrasa el incremento de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk) que esta asociada a la apoptosis inducida por dexametasona. En contraste con lo que sucede con la sobreexpresión de Bax la que potencia la actividad de Cdk2 [67]. En las células de mieloma múltiple, Bcl-2 promueve la sobrevivencia por inhibición de la degradación de los factores de transcripción tales como c-Fos y NF- κ B por el proteasoma y antagonizando la degradación inducida por DEX de c-Fos a través del proteasoma. Ello no requiere la interacción con la expresión del inhibidor y antagonista I κ B pero si un poco con la vía de señalización río arriba para la activación de NF- κ B, posiblemente sea por la estabilización del enlace de NF- κ B a el DNA a través de la inhibición de su degradación proteasomica [68]

El año pasado se reportó que la sobreexpresión de Bcl-2 en células transfectadas produce que las moléculas de Bcl-2 se redistribuyan hacia la membrana nuclear, impidiendo con ello que

se lleven a cabo las función de NF- κ B, al parecer ello sucede debido a que Bcl-2 se enlaza a la molécula de NF- κ B activa, impidiendo que ésta se transloque al núcleo. Por otra parte se encontró que al expresar del mismo modo a la molécula de FKBP38 (de la cual se hablará con más detalle adelante) quien se ha demostrado que dirige a Bcl-2 a la membrana mitocondrial externa, las moléculas de Bcl-2 que estaban en el núcleo se redirigían de nuevo hacia mitocondria, encontrando de esta manera que se restauraba la translocación y función de NF- κ B. Este hecho sugiere la posibilidad de que la sobreexpresión de Bcl-2 en las células sea una señal de un daño excesivo que culmina con la muerte de la célula, y que en estos casos la cantidad de FKBP38 no sea la suficiente como para que Bcl-2 pueda cumplir con su función antiapoptótica al anclarse a la membrana mitocondrial, más por el contrario su acumulación nuclear altera la actividad de NF- κ B, lo cual podría dependiendo de la intensidad del daño causar la muerte de las células [69]

Es sabido que para algunas células la baja en la actividad del factor de transcripción NF- κ B, no es compatible con la vida, ya que provoca alteraciones importantes que no permiten la sobrevivencia.

En tanto que los GC han demostrado inhibir la producción de citocinas, la proliferación celular [70 y 71] la inducción y aceleración de la apoptosis [72] (en donde participan principalmente los miembros de la familia Bcl-2) , varios estudios se han enfocado en las relaciones existentes entre la inmunosupresión que causan los GC, y la modulación de la familia Bcl-2 con el proceso de muerte celular.

2.3 INMUNOFILINAS

Las inmunofilinas son proteínas intracelulares ubicuas y conservadas que se enlazan a fármacos supresores del sistema inmune, tales como FK506, rapamicina, y ciclosporina *A* [73]. Todos los miembros de la familia de las inmunofilinas tienen actividad de peptidilprolil isomerasa (PPIase), esto sugiere la idea de que quizá estas tengan una función importante en el plegamiento de ciertas proteínas dentro de la célula. A las inmunofilinas se les puede dividir en dos clases; las FKBP's que son proteínas de unión a FK506 y rapamicina; y las que se enlazan a ciclosporina *A*, llamadas ciclofilinas (CyP's). Los fármacos inmunosupresores ocupan los sitios prolil isomeras de las inmunofilinas e inhiben *in vitro* la isomerización *cis-trans* de los enlaces peptidil-prolil. Si bien lo anterior es solo una limitada evidencia de que las inmunofilinas juegan un papel importante en el plegamiento de proteínas *in vivo*. Casi toda la información disponible acerca de las inmunofilinas relaciona el bajo peso molecular de sus miembros, tales como FK52 y CyP-18, los cuales son componentes celulares responsables de la inhibición de la activación de las células T.

Las inmunofilinas poseen dominios repetidos de tetratricopeptido (TPR) y dominios de enlace a calmodulina en la parte media carboxiterminal. Estos TPR son frecuentemente arreglados en tandems repetidos, y ellos son sitios donde se dan interacciones intra e intermoleculares. Se ha visto que hsp90 se enlaza a una gran variedad de proteínas que contienen de 3 a 7 dominios TPRs, incluyendo a las inmunofilinas (Fig. 8).

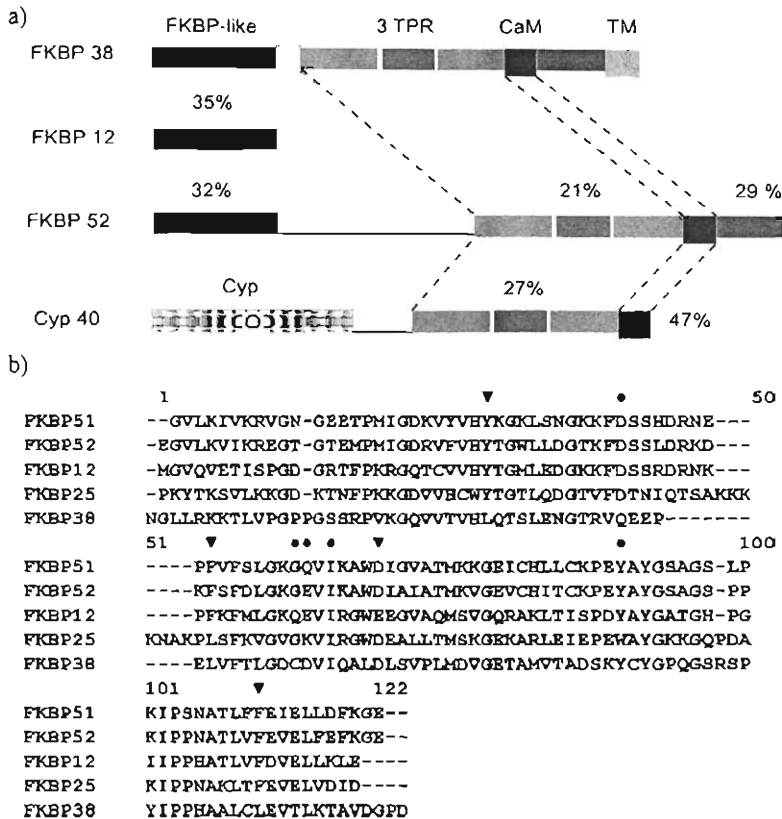


Figura 8. a) Estructuras algunas inmunofilinas humanas y proteínas relacionadas que muestran el dominio FKBP, el dominio de ciclofilina (Cyp), dominios TPRs, sitio de unión a calmodulina (CaM), y dominios transmembrana (TM). Se muestran los porcentajes de identidad de las secuencias de las proteínas relacionadas y la correspondiente región de las FKBP. b) Alineamiento de las secuencias de las diferentes inmunofilinas que muestran los residuos del sitio de unión a FK506 con triángulos inversos (▼) y con un punto negro (●) los que se enlazan a través de puentes de hidrógeno a esta molécula.

El enlace de las inmunofilinas con hsp90 mediante los dominios TPR es conservado tanto en plantas como en animales superiores, sugiriendo que quizás sea una interacción básica entre proteínas y sea a su vez crítica para la funcionalidad de las inmunofilinas de alto peso molecular [74].

La FKBP12 es el miembro mejor caracterizado de la familia de las inmunofilinas FKBP, que interacciona con la calcineurina solo en presencia de FK506. Los estudios estructurales han mostrado que el complejo FKBP12-FK506 se enlaza perfectamente a la calcineurina. La calcineurina es una proteína serina/treonina fosfatasa que es activada por calcio y calmodulina, está implicada tanto en eventos de transducción de señales como en la apoptosis [75,76].

2.3.1. FKBP38

Otra inmunofilina que es de particular interés es la FKBP38 que muestra una secuencia substancialmente similar con FKBP12, FKBP52 y Cyp-40 [77]. Tanto FKBP52 como Cyp-40 se enlazan al receptor de glucocorticoides y participan en el tráfico del receptor de glucocorticoides entre el citoplasma y el núcleo. La región amino terminal de FKBP38 contiene un dominio de FKBP (una secuencia que esta conservada en todos los miembros de la familia de FKBP y es responsable tanto de su enlace a FK506 y como para su actividad de peptidilprolil trans-isomerasa (PPIasa). A pesar de las similitudes de los dominios FKBP con los de FKBP38, los aminoácidos necesarios para su enlace con FK506 y para la actividad PPIasa no son conservados en FKBP38, sugiriendo que quizás esta proteína no tiene ni la actividad de PPIasa ni la capacidad de unirse a FK506. Estas características hacen que FKBP38 sea única en toda la familia de las FKBP, y sugiere que tiene una función independiente de FK506 (**Fig. 8**).

Como se mencionó anteriormente diferentes estímulos apoptóticos inducen la disfunción mitocondrial, incluyendo la liberación de citocromo *c*, el factor inductor de apoptosis y Smac (también conocido como diablo), y también la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Así mismo las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L protegen a la célula en contra de todos estos eventos mitocondriales por la inhibición de proteínas pro-apoptóticas y previniendo la transición de la permeabilidad mitocondrial. Tanto Bcl-2 como Bcl-x_L son proteínas de membrana localizadas predominantemente en la mitocondria. En contraste para Bcl-

2 y Bcl-x_L quizás los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, incluidos Bax , Bad, Bid y Bim, se localizan en el citosol de las células antes de ser expuestas a señales de muerte. En respuesta a un inductor, estas proteínas se translocan a la membrana mitocondrial y contrarrestan los efectos anti-apoptóticos de Bcl-2 y Bcl-x_L. Aunque la localización mitocondrial de Bcl-2 y Bcl-x_L parece ser crucial para sus funciones antiapoptóticas, los mecanismos moleculares por los cuales estas proteínas se translocan a membrana y por los cuales permanecen unidas a mitocondria todavía no se han esclarecido.

Es sabido que la familia de las Bcl-2 son frecuentemente reguladas por modificación postraducciona, lo que puede controlar su actividad y conformación. La proteína Bcl-2 tiene residuos específicos que pueden ser fosforilados bajo ciertas circunstancias; por ejemplo se ha encontrado que en un estado fosforilado Bcl-2 se inactiva, mientras que una mutación en los residuos fosforilables demuestra su eficacia como molécula antiapoptótica. La forma fosforilada de Bcl-2 fue detectada en el retículo endoplásmico (RE) lo que hace que esta sea incapaz de unirse a proteínas propapóticas. Recientemente en estudios *in vitro* se encontró que la fosforilación de Bcl-2 puede ser fuertemente inhibida en presencia de FKBP38, al parecer esto es debido a que FKBP38 interacciona con un loop no estructurado de Bcl-2, haciendo que sea poco probable tener un sitio libre para la fosforilación que inactive a la proteína. Estos resultados sugieren un efecto regulatorio por parte de la inmunofilina a través del bloqueo de los sitios fosforilación.[78]

Por otra parte se tiene evidencia de que FKBP38 puede modular la apoptosis por interacción directa con la calcineurina, actuando como su inhibidor [79]. Sin embargo recientemente se ha publicado que esto no es del todo cierto [80]. La calcineurina (una proteína fosfatasa 2B, CaN) que está relacionada con la señalización intracelular de calmodulina/Ca²⁺ quien realiza la desfosforilación de muchas proteínas importantes tales como los factores retranscripción NFAT, MRF2, Elk1, así como también la óxido nítrico sintasa y la subunidad

regulatoria RII del AMPc que es dependiente de proteínas cinasas. Por ende esta enzima se acopla a la señalización de calcio para apoptosis y el control transcripcional en el sistema inmune, además de los sistemas nervioso y cardiovascular. Si bien cuando se utiliza compuestos tales como FK505 y ciclosporina (CsA) como inmunosupresor, estos actúan como potentes inhibidores de CaN debido a la formación del complejo FK506/FKBP12/CaN. FK506 necesita la presencia de FKBP12 para poder ejercer su efecto inhibitorio sobre la calcineurina, lo mismo para CsA que se une a la ciclofilina 18, ya que se ha demostrado que cuando alguna de estas proteínas se encuentra ausente, no hay ningún efecto sobre CaN. La interacción de estos complejos no se da a través de su unión con el sitio activo de la CaN.

En relación con lo anterior se había encontrado evidencia que sugería la posibilidad de que FKBP38 podría ejercer el mismo efecto que el complejo FK506/FKBP12; el de inhibir a la CaN y con ello la consecuente supresión de la respuesta inmune y de la apoptosis. Lo novedoso de esta evidencia es el hecho de que FKBP38 no requería la unión del fármaco FK506 para inhibir a la fosfatasa, por ello es que se le atribuyó el título de inhibidor inherente de CaN [74]. En una publicación de este año muestran que lo anterior no es del todo verdadero, ya que en sus experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* encontraron que FKBP38 humana no actúa como inhibidor inherente de la CaN, lo que es más se necesita de la presencia de FK506 para que FKBP38 pueda inhibir la función de la CaN [75].

Lo que es de relevancia para este trabajo es la evidencia encontrada que afirma que FKBP38 se une Bcl-2 en la membrana mitocondrial externa y que la localización mitocondrial de esas proteínas antiapoptóticas es importante para la inhibición de la apoptosis. Para demostrar lo anterior, primero que nada realizaron tinciones que indicaban que FKBP38 se localizaba en la membrana mitocondrial y en cercanía con Bcl-2 y Bcl-xL, mientras que otras inmunofilinas se encontraban en el citoplasma. Paralelamente se llevaron a cabo ensayos produciendo proteínas de FKBP38 mutantes que no presentan el dominio FKBP, lo que impide su unión con Bcl-2 y Bcl-

xL por lo que esta no puede insertarse en la membrana mitocondrial ni cumplir con su función antiapoptótica, ello sugiere que la función principal de la FKBP38 es la de dirigir a Bcl-2 hacia la membrana mitocondrial, para reafirmar este hecho se obtuvieron mutantes de FKBP38 a una de ellas le fue eliminada la secuencia señal de unión a membrana mitocondrial y otra a la cual se le adicionaron péptidos para dirigir a FKBP38 a la membrana citoplasmática, encontrando que tanto FKBP38 junto con Bcl-2 y Bcl-xL colocalizaban respectivamente en la membrana mitocondrial y en el citoplasma. Así mismo se utilizó un RNA de interferencia para FKBP38 lo cual reducía su expresión notablemente, encontrando que tanto Bcl-2 y Bcl-xL se encontraban dispersos en el citoplasma. Con toda la información anterior podemos afirmar que FKBP38 es una proteína crucial para la función de Bcl-2, en este caso en la translocación de ésta a la membrana mitocondrial [75,81].

Son muy pocos los estudios que hay acerca de esta inmunofilina en su interacción con Bcl-2, por lo que en el presente trabajo se intenta relacionar la expresión de estas dos moléculas en presencia de glucocorticoides a diferentes tiempos, lo que quizás nos estaría dando patrones de comportamiento de ambas moléculas.

III.- OBJETIVO E HIPOTESIS

3.1 OBJETIVO

Determinación semicuantitativa de la expresión de los genes de la FKBP38 y Bcl-2 a nivel de mRNA en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de glucocorticoides, así como un análisis en la fragmentación del DNA en cada uno de los diferentes casos.

3.2 HIPOTESIS

Los glucocorticoides disminuirán la expresión de los mensajeros de Bcl-2 y la de la inmunofilina FKBP38.

Se espera que a una mayor cantidad de expresión de ambos mensajeros tengamos a su vez una disminución en la fragmentación del DNA dependiente de la disminución en la concentración del glucocorticoide.

IV.- METODOS Y TÉCNICAS

4.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

- 1.-Hacer una dilución 50% con sangre total obtenida de donadores sanos y PBS 1X
- 2.- Colocar una tercera parte de Ficoll en el fondo de otro tubo, y posteriormente adicionar lentamente las dos partes restantes de la sangre diluida en el paso anterior
- 3.- Centrifugar de a 1600 rpm 30 min.
- 4.- Obtener la interfase blanquecina (que es donde se encuentran las PBMC) con una pipeta Pasteur, y depositarla cuidadosamente en otro tubo.
- 5.- Inmediatamente llenar hasta el tope del tubo con PBS 1X
- 6.- Centrifugar a 1800 r.p.m. durante 10 min.
- 7.- Decantar el sobrenadante, resuspender el botón celular en el líquido que escurre por las paredes después de haber decantado, a continuación adicionar PBS 1X
- 8.- Centrifugar a 1800 r.p.m. durante 10 min.
- 9.- Decantar el sobrenadante
- 10.- Resuspender el botón celular en 1000 μ l de medio RPMI 1480

4.2 CUENTA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

- 1.- Una vez resuspendido el botón celular se toman 20 μ l y se colocan en un tubo eppendorf y se añaden 20 μ l de azul tripano.

- 2.- Se toma una alícuota de 10 μ l de la mezcla anterior y se depositan en la Camara de Neubauer.
- 3.- Se cuentan los cuatro cuadrantes de las esquinas
- 4.- Calcular el número de células mediante la formula siguiente:

$$(\text{SUMA DE LOS 4 CUADRANTES} / 4) \times 10^4 \times 2 = \text{No. Células} / \text{ml}$$

2 = factor de la dilución al mezclar con el colorante

10^4 = factor de la Camara

4.3 CULTIVO CELULAR

Se trabaja siempre en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. Se utilizan microplacas de 24 pozos (Costar) a la que a cada pozo se deposita un total de 1, 000,000 células/ml de medio RPMI

Después de haber extraído los mononucleares de sangre periférica se dejan 24 h únicamente con medio RPMI en la estufa a 37°C , 5 % de CO₂, para posteriormente darles los tratamientos correspondientes.

Los estímulos para cada cultivo celular se describen a continuación:

Se tiene cuidado especial en el caso de las cajas que contienen RU486, ya que primero se adiciona el Cortisol o Dexametasona y a continuación el antagonista de glucocorticoides el RU 486

Caja No.1 CORTISOL

3h	6h	9 h	12 h	24 h	48 h
Cortisol 10^{-6}	Cortisol 10^{-6}	Cortisol 10^{-6}	Cortisol 10^{-6}	Cortisol 10^{-6}	Cortisol 10^{-6}
Cortisol 10^{-8}	Cortisol 10^{-8}	Cortisol 10^{-8}	Cortisol 10^{-8}	Cortisol 10^{-8}	Cortisol 10^{-8}
Cortisol 10^{-10}	Cortisol 10^{-10}	Cortisol 10^{-10}	Cortisol 10^{-10}	Cortisol 10^{-10}	Cortisol 10^{-10}
Control	Control	Control	Control	Control	Control

Caja No.2 DEXAMETASONA

3h	6h	9 h	12 h	24 h	48h
Dexametasona 10^{-6}	Dexametasona 10^{-6}	Dexametasona 10^{-6}	Dexametasona 10^{-6}	Dexametasona 10^{-6}	Dexametasona 10^{-6}
Dexametasona 10^{-8}	Dexametasona 10^{-8}	Dexametasona 10^{-8}	Dexametasona 10^{-8}	Dexametasona 10^{-8}	Dexametasona 10^{-8}
Dexametasona 10^{-10}	Dexametasona 10^{-10}	Dexametasona 10^{-10}	Dexametasona 10^{-10}	Dexametasona 10^{-10}	Dexametasona 10^{-10}
Control de RU 486 10^{-5}	Control de RU 486 10^{-5}	Control de RU 486 10^{-5}	Control de RU 486 10^{-5}	Control de RU 486 10^{-5}	Control de RU 486 10^{-5}

Caja No.3 **CORTISOL + RU 486**

3h	6h	9 h	12 h	24 h	48 h
Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Cortisol 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵
Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷	Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷	Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷	Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷	Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷	Cortisol 10 ⁻⁸ Ru 486 10 ⁻⁷
Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹	Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹	Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹	Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹	Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹	Cortisol 10 ⁻¹⁰ Ru486 10 ⁻⁹
Control de RU 486 10 ⁻⁷	Control de RU 486 10 ⁻⁷	Control de RU 486 10 ⁻⁷	Control de RU 486 10 ⁻⁷	Control de RU 486 10 ⁻⁷	Control de RU 486 10 ⁻⁷

Caja No.4 **DEXAMETASONA + RU 486**

3h	9h	12 h	24h	48h	72h
Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵
Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵	Dexametasona 10 ⁻⁶ RU 486 10 ⁻⁵
Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹	Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹	Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹	Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹	Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹	Dexametasona 10 ⁻¹⁰ RU 486 10 ⁻⁹
Control de RU 486 10 ⁻⁹	Control de RU 486 10 ⁻⁹	Control de RU 486 10 ⁻⁹	Control de RU 486 10 ⁻⁹	Control de RU 486 10 ⁻⁹	Control de RU 486 10 ⁻⁹

Se toman las muestras de las cuatro cajas en los tiempos indicados de las tres diferentes concentraciones incluyendo controles.

4.4 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL

- a) Tomar las células de cada pozo por separado y adicionar PBS 1X (para lavar)
- b) Centrifugar a 1800 rpm durante 15 min., a temperatura ambiente y decantar el sobrenadante
- c) desechar el sobrenadante y agregar 250 μ l de Trizol / 2×10^6 células utilizadas (si no se procesan de inmediato las muestras se almacenan a -70 °C hasta la purificación posterior de los ácidos nucleicos y las proteínas).
- d) incubar las muestras homogenizadas por 5 min., a temperatura ambiente
- e) adicionar 200 μ l de cloroformo/ mL de trizol utilizado, mezclar en el vortex por 15 seg., e incubar por 10 min. a temperatura ambiente
- f) centrifugar a 12,000 rpm 10 min., a una temperatura de 4 °C
- g) en este paso se observan 3 fases, la superior es una fase acuosa que contiene al RNA total, la fase blanca intermedia contiene las proteínas, y la fase inferior color rosa mexicano contiene el DNA
- h) tomar la fase transparente y pasarla a un tubo nuevo, y guardar la fase orgánica si se desea purificar ácido desoxirribonucleico (DNA) o proteínas
- i) precipitar el RNA adicionando 800 μ l de alcohol isopropilico por cada mL de trizol utilizado, mezclar suavemente e incubar las muestras a temperatura ambiente por 10 min.
- j) centrifugar durante 10 min a 12,000 rpm , a una temperatura de 4 °C
- k) desechar el sobrenadante y lavar el RNA con al menos 500 μ l de etanol al 75%, y mezclar
- l) centrifugar a 12,000 rpm 10 min., a una temperatura de 4 °C
- m) desechar el sobrenadante y dejar secar el RNA, de 5 a 10 min. a temperatura ambiente
- n) disolver el RNA en 30 μ l de agua libre de RNAsas, mezclar

o) cuantificar la concentración, de RNA presente en cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda 260 y 280 nm, y el cociente A260/a280

4.5 ENSAYO DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

1.- Se prepara un gel de agarosa de las siguientes características

Agarosa	1%
Amortiguador de corrida 5X	20%
Formaldehído 12.3 M	17%
Agua libre de RNAsas	62 %

Es importante que se trabaje con el paraformaldehído en la campana.

2.- Mientras el gel solidifica, las muestras se preparan de la siguiente manera:

En un tubo Eppendorf se adiciona

Solución que contiene 3µg de RNA

Amortiguador de corrida 5X (OMPS)	2 µl
Formaldehído	3.5 µl
Formamida	10 µl

3.- La mezcla se incuba por 15 min. a 65 °C , a continuación se enfría en hielo

4.- Se centrifuga por 5 min. para depositar el fluido en el fondo

5.- Se adicionan 2 µl de amortiguador de carga para RNA y se mezcla

6.- Una vez que el gel ha solidificado se carga con la muestras recién preparadas.

7.- Posteriormente el gel se corre en la cámara de electroforesis a 65 V

4.6 OBTENCIÓN DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) A PARTIR DE RNA TOTAL MEDIANTE RT-PCR

Se toma el volumen de las muestras anteriores que contenga exactamente 1 µg de RNA se adiciona una cantidad de agua mínima calculada, para que se incuben cada muestra a 70°C 10 min., inmediatamente después se pasan a 4°C para adicionar a cada tubo los siguientes reactivos:

Reactivos	µerolitros
Agua	10
Buffer 10X	2
Oligo dT 50 µM	1
dNTPs 10mM	1
(enzima) MuLV 200 U/µl	0.5
RNA total* 1µg	Supóngase 5.5
Vol. Final de reacción	20 µL

*Es muy importante el cálculo de las concentraciones de RNA total obtenidos al final de la extracción para cada tubo, ya que de eso depende el volumen a agregar de RNA para que contenga tan solo 1 µg de RNA el tubo donde se llevara a cabo la reacción de RT-PCR

Una vez obtenida la mezcla, siendo la enzima quien se adiciona al final, se introducen en el termociclador.

El programa que se utiliza es de 37°C 1h y posterior a ello se lleva cabo otro ciclo de 10 min. a 70 C.

4.7 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR)

Se realizan las siguientes mezclas por cada muestra a procesar, y para cada uno de los siguientes oligonucleotidos :

PARA GADPH

Reactivos	microlitros
Buffer 10X	2.5
dNTPs 10 mM	1
Enzima 200 U / μ l	0.5
Oligos de GADPH 5 μ M	2
cDNA	5
H ₂ O	14
Vol. Final de reacción	25 μL

Programa que ejecuta el termociclador para GADPH

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo (min)
1	95	05:00
2	95	00:50
3	56	00:45
4	72	00:45
5	72	04:00

Este ciclo se repite 30 veces

PARA FKBP38

Reactivos	microlitros
Buffer 10X	2.5
dNTPs	1
Enzima	0.5
Oligos de FKBP 38	2
cDNA	5
H ₂ O	14
Vol. Final de reacción	25 μL

Programa que ejecuta el termociclador para FKBP 38

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo (min)
1	95	05:00
2	95	00:50
3	60	00:45
4	72	00:45
5	72	04:00

Este se repite 30 veces

PARA Bcl-2

Reactivos	µrolitros
Buffer 10X	2.5
dNTPs	1
Enzima	0.5
Oligos de Bcl-2	2
cDNA	5
H ₂ O	14
Vol. Final de reacción	25 µL

Programa que ejecuta el termociclador para Bcl-2

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo (min)
1	95	05:00
2	95	00:50
3	58	00:45
4	72	00:45
5	72	04:00

Este ciclo se repite 30 veces

4.8 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTO DE LA REACCIÓN DE PCR

Se preparan geles de agarosa al 1.2% disueltas en solución de TBE 0.5X, se mezclan 5µl de producto de PCR más 1 µL de colorante y se cargan en los pozos del gel, iniciando en el pozo uno con el marcador de pares de bases. Posteriormente se corre el gel en una caja para electroforesis utilizando como Buffer de corrida TBE al 0.5X a 80 Volts. Luego los geles son teñidos con bromuro de etidio, para su posterior análisis.

Una vez teñidos los geles son fotografiados dentro del Transiluminador UVP, y se realizan las lecturas de densidad óptica con el programa LabWorks 4.0.

4.9 DETECCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE DNA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La fragmentación de DNA ha sido utilizado como marcador bioquímico de apoptosis, debido a que una vez que en las células se ha fragmentado su DNA, éstas están destinadas a morir y no hay mecanismos que rescaten de tal señalización apoptótica. En este estudio se utilizó esta técnica para evaluar el fenómeno de apoptosis

- 1.- Después del período de incubación de las células, se extraen y se lavan con PBS 1X dos veces
- 2.- Se adicionan 500 µl de solución de lisis, y se incubó a 50° durante 2 h
- 3.- Después se realizó una extracción fenol/cloroformo seguida de una precipitación con etanol.
- 4.- Las muestras se cargaron en un gel de azarosa al 1% que posteriormente se visualizo con una tinción con bromuro de etidio.

V.- RESULTADOS

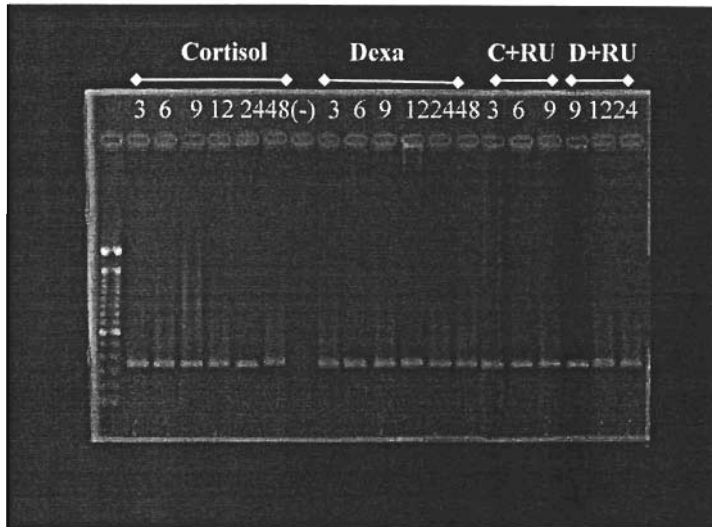


Fig. 9 GADPH

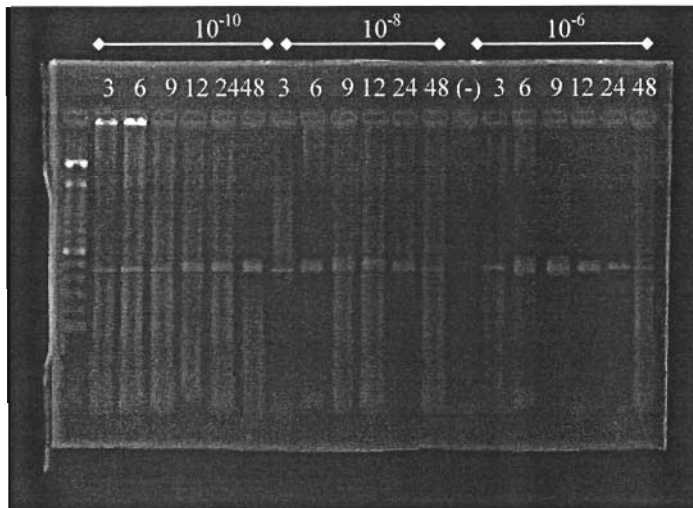


Fig. 10 Bcl-2 en presencia de Cortisol

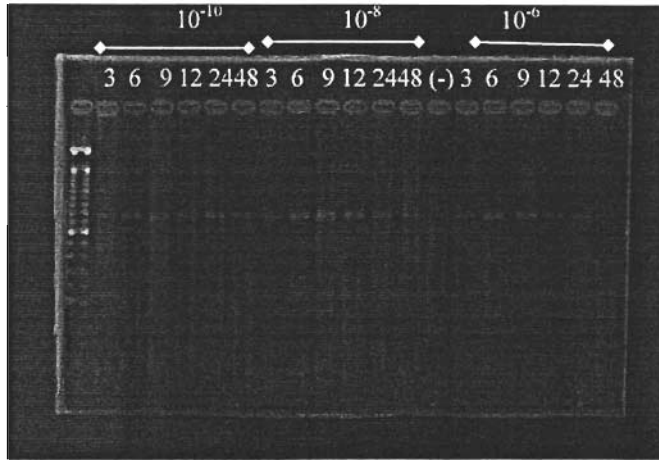


Fig. 11 FKBP 38 en presencia de Cortisol

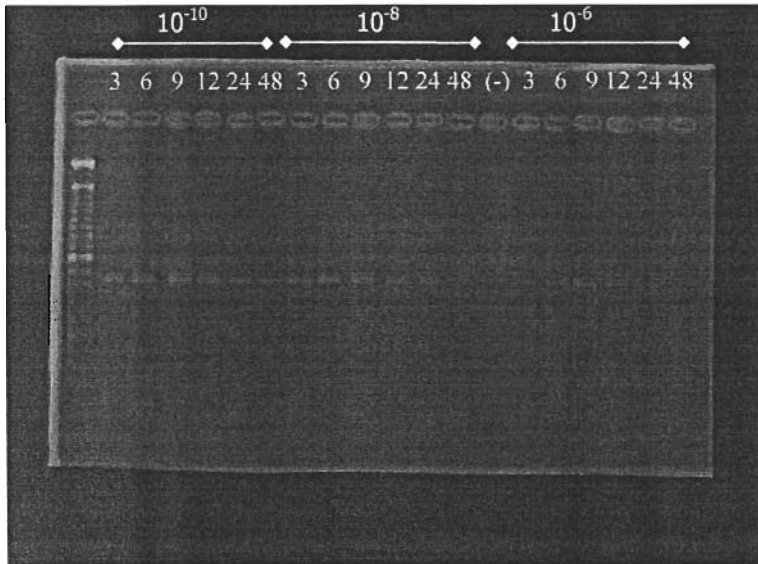


Fig. 12 Bcl-2 en presencia de Dexametasona

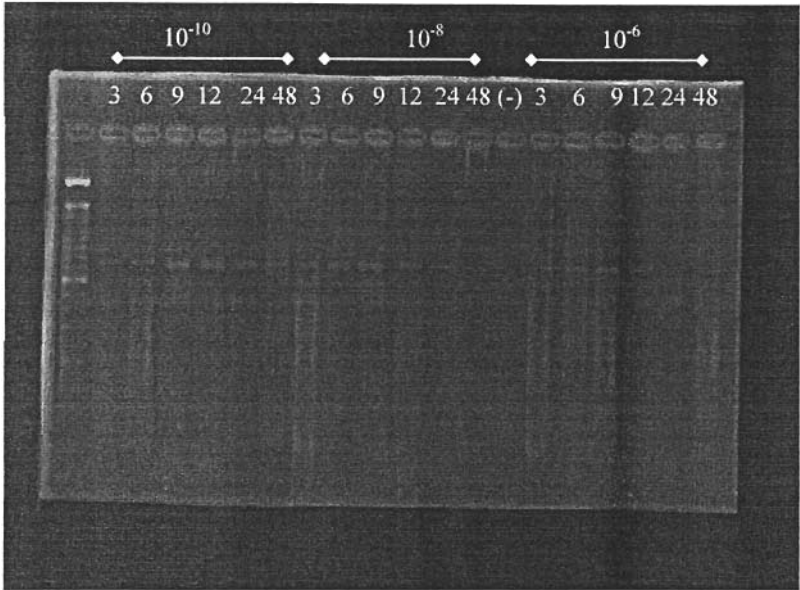


Fig. 13 FKBP38 en presencia de Dexametasona

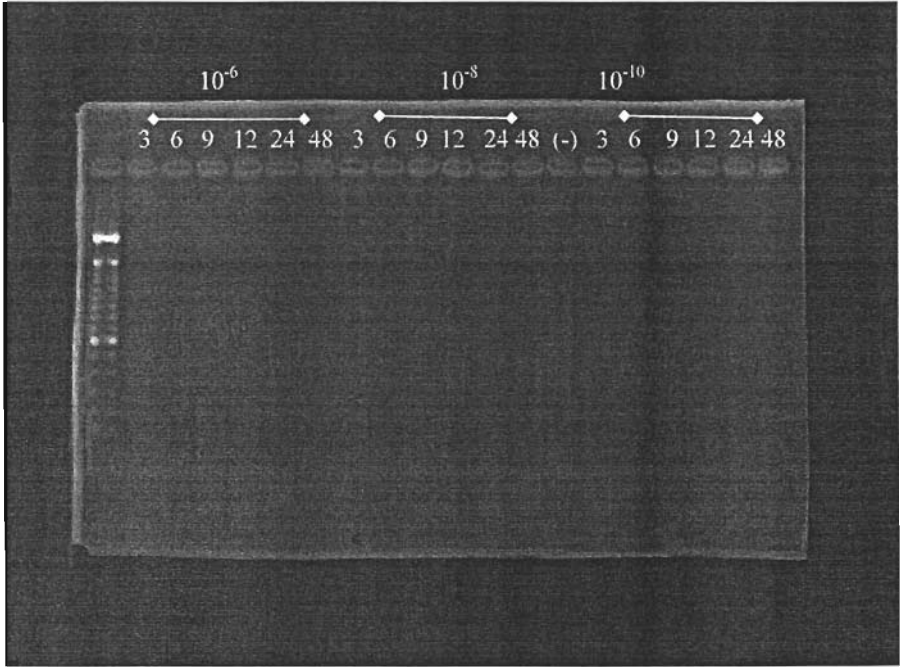


Fig. 14 Bcl-2 en presencia de C+RU

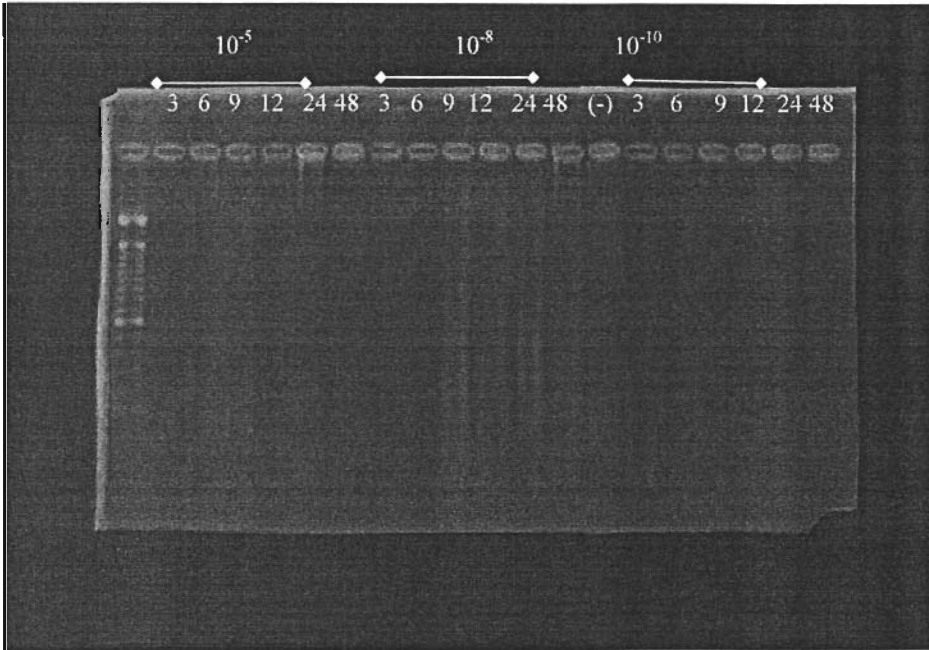


Fig. 15 FKBP38 en presencia deC+RU

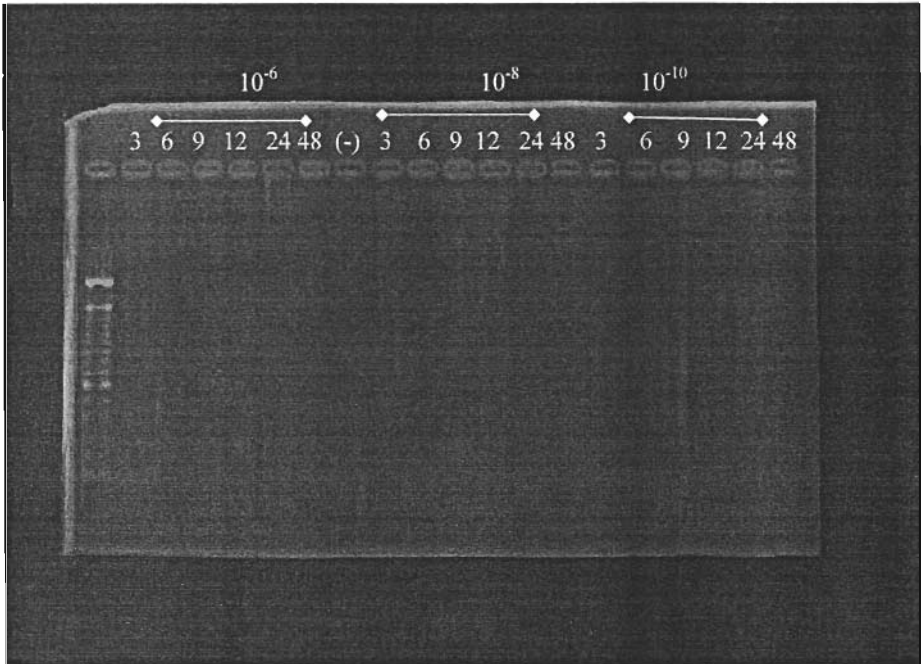


Fig. 16 Bcl-2 en presencia de D+RU

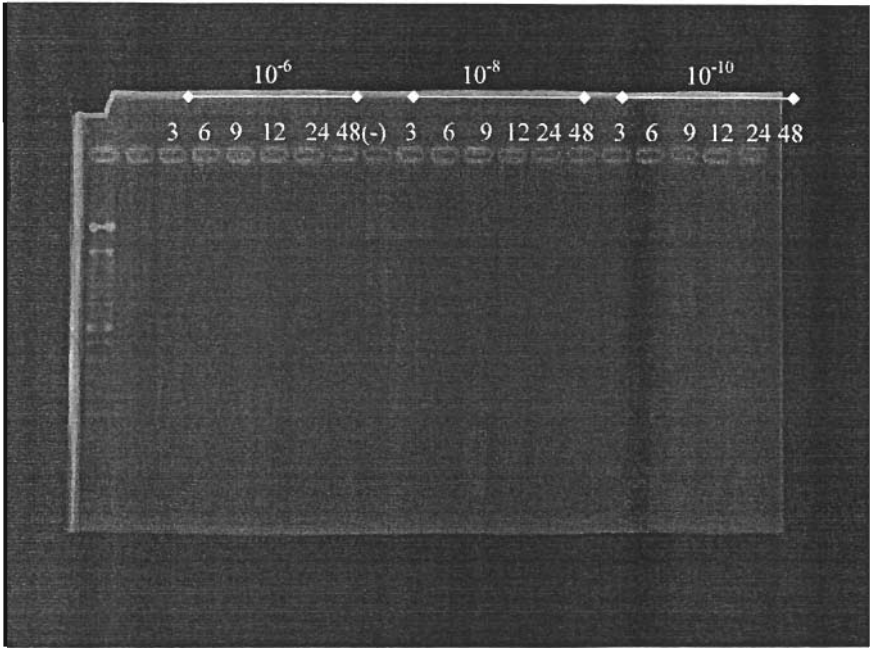


Fig. 17 FKBP 38 en presencia de D+RU

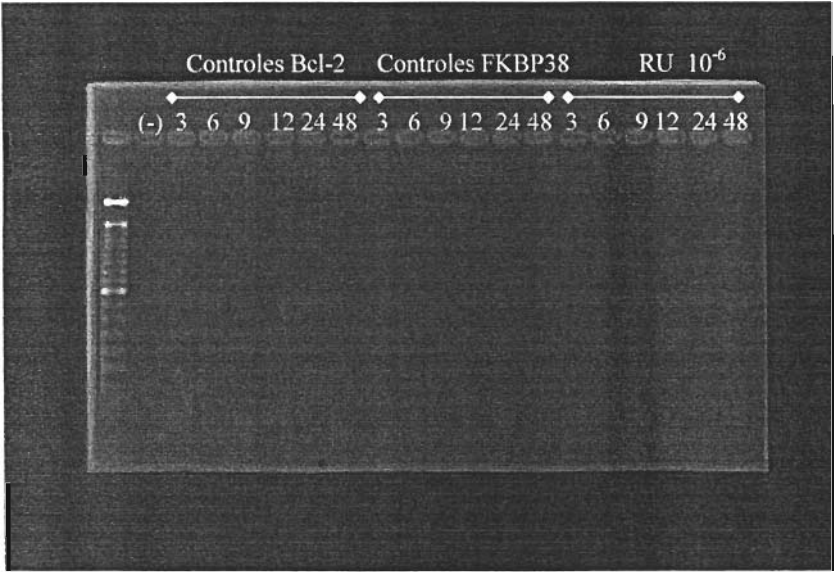


Fig. 18 Controles

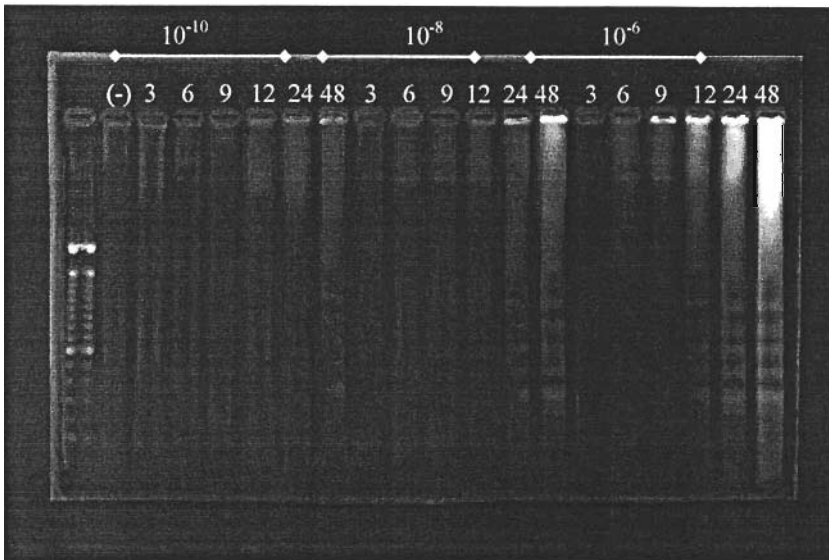


Fig. 19 Escalera de apoptosis a diferentes concentraciones de Cortisol

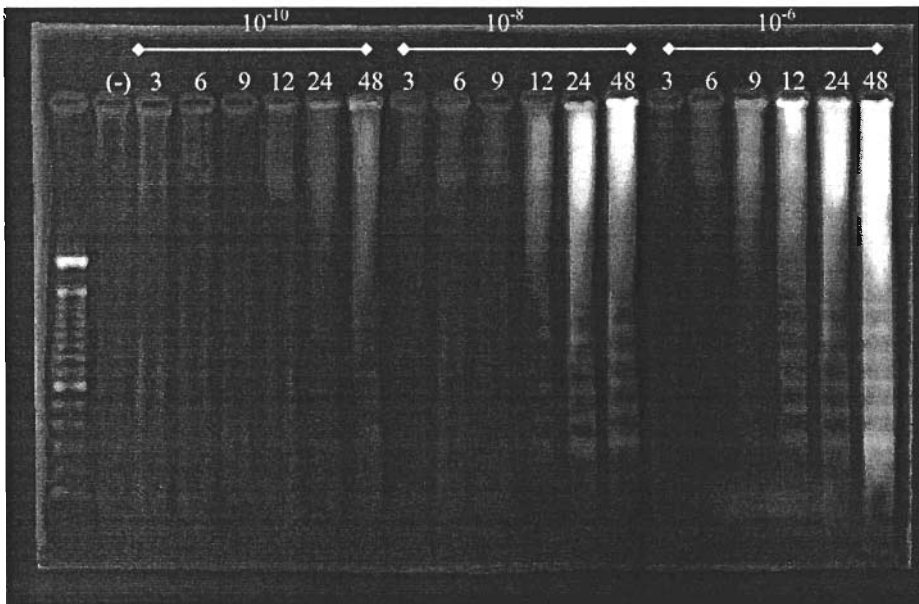


Fig. 20 Escalera de apoptosis a diferentes concentraciones de Dexametasona

Tabla 1 Densidades ópticas de las bandas de la expresión de Bcl-2 en el control (Cntr), Cortisol+RU486 (C+RU), Dexametasona +RU 486 (D+RU), y de RU486 (RU)

(h)	Cntr	C+RU 10 ⁻⁶	C+RU 10 ⁻⁸	C+RU 10 ⁻¹⁰	D+RU 10 ⁻⁶	D+RU 10 ⁻⁸	D+RU 10 ⁻¹⁰	RU 10 ⁻⁶	RU 10 ⁻⁸	RU 10 ⁻¹⁰
3	0.985	0.876	0.946	0.657	0.986	0.823	0.512	0.875	0.756	0.798
6	0.983	0.984	1.231	0.522	1.245	0.934	0.528	0.876	0.830	0.727
9	1.346	1.036	1.112	0.604	1.45	0.652	0.402	0.899	0.799	0.645
12	1.267	1.005	0.958	0.574	1.345	0.786	0.856	0.813	0.745	0.576
24	1.567	0.973	0.824	0.803	1.42	0.743	0.793	0.986	0.643	0.784
48	0.897	0.876	0.963	0.816	1.489	0.876	0.719	0.873	0.704	0.694

Tabla 2 Densidades ópticas de las bandas de la expresión de FKBP38 en el control (Cntr), Cortisol+RU486 (C+RU), Dexametasona +RU 486 (D+RU), y de RU486 (RU)

(h)	Cntr	C+RU 10 ⁻⁶	C+RU 10 ⁻⁸	C+RU 10 ⁻¹⁰	D+RU 10 ⁻⁶	D+RU 10 ⁻⁸	D+RU 10 ⁻¹⁰	RU 10 ⁻⁶	RU 10 ⁻⁸	RU 10 ⁻¹⁰
3	1.243	1.453	0.950	0.786	1.345	0.975	0.875	1.290	0.956	0.962
6	1.080	1.874	0.914	0.852	1.230	0.823	0.910	1.027	0.896	0.984
9	0.932	0.986	1.203	0.740	1.024	0.945	0.945	0.993	0.951	0.870
12	0.912	0.894	1.125	1.003	1.006	0.892	0.977	1.204	1.156	1.059
24	0.953	0.790	0.984	0.923	1.186	0.953	0.927	0.967	1.172	1.204
48	0.952	0.941	1.031	0.895	0.923	0.972	0.918	0.936	0.946	0.978

Tabla 3. Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-6}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	24.98	20.925
6	49.92	43.05
9	51.52	44.987
12	33.239	21.345
24	15.945	12.698
48	10.239	9.432

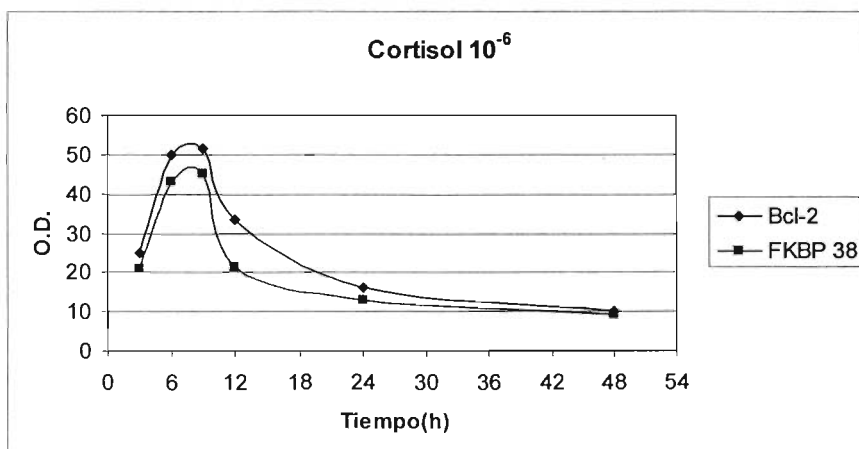


Fig. 21 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-6}

Tabla 4 Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-8}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	16.845	12.758
6	25.934	20.874
9	64.343	50.128
12	42.263	33.546
24	23.554	19.783
48	9.786	10.002

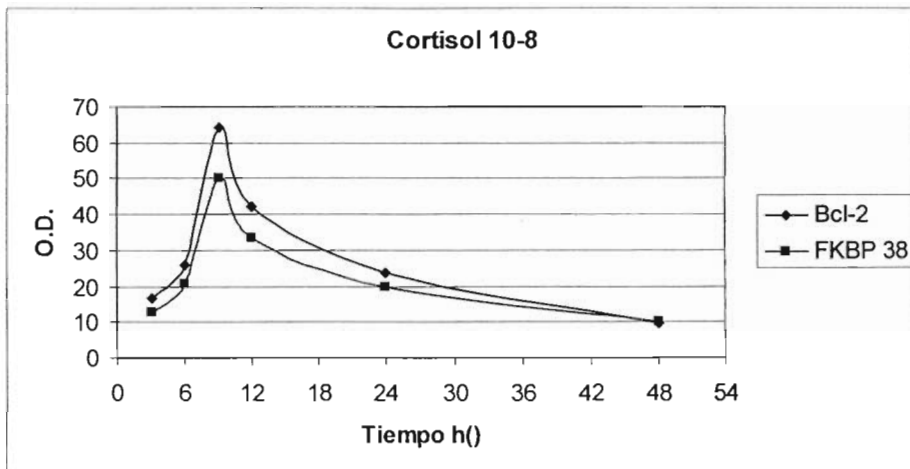


Fig. 22 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-8}

Tabla 5 Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-10}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	8.723	8.036
6	15.695	16.953
9	25.272	19.365
12	26.225	20.056
24	23.341	23.138
48	18.746	18.345

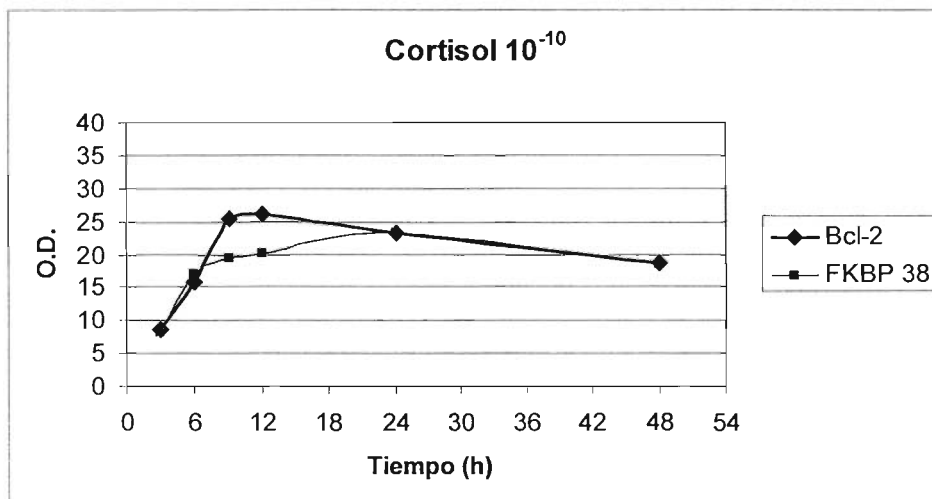


Fig. 23 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Cortisol 1×10^{-10}

Tabla 6 Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-6}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	14.983	15.228
6	25.002	23.673
9	26.269	20.765
12	15.983	18.832
24	12.983	0
48	0	0

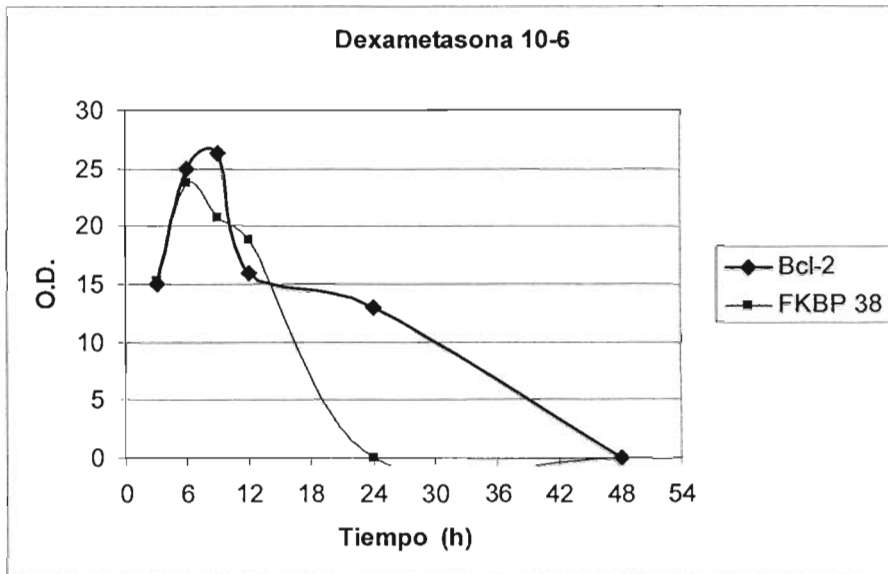


Fig. 24 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-6}

Tabla 7 Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-8}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	19.764	15.837
6	22.67	18.492
9	29.675	25.352
12	15.985	13.651
24	13.273	11.352
48	0	0

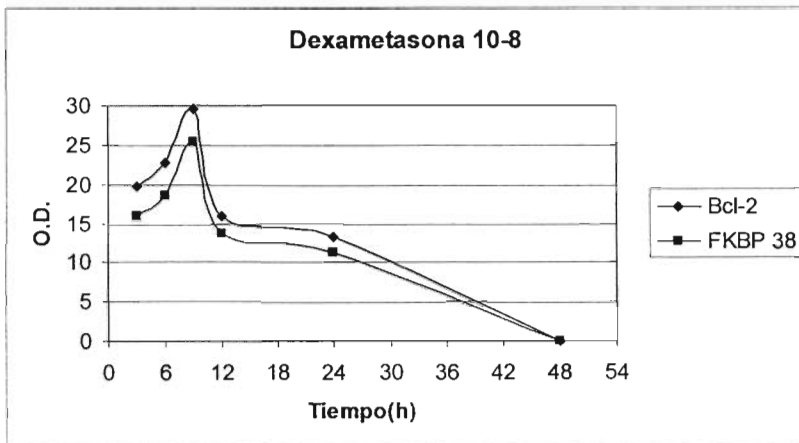


Fig. 25 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-8}

Tabla 8 Expresión de Bcl-2 y FKBP38 en células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-10}

Tiempo (h)	O.D. para Bcl-2	O.D. para FKBP 38
3	15.986	13.985
6	22.18	18.234
9	27.943	24.873
12	25.984	22.65
24	18.534	17.502
48	18.351	16.126

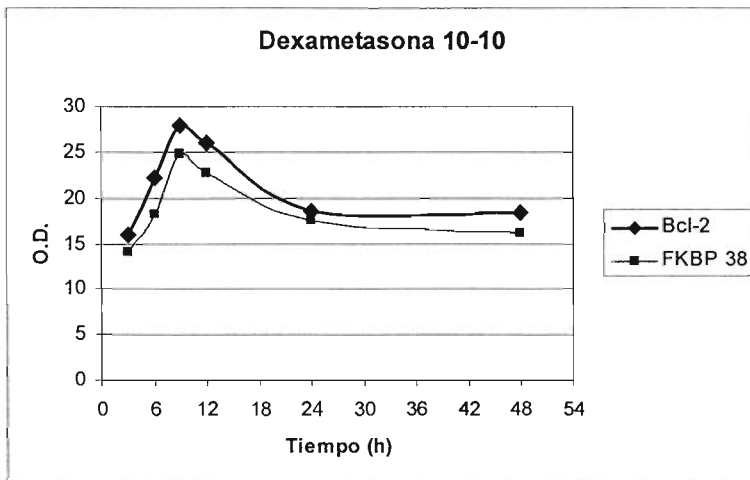


Fig. 26 Gráfica de la expresión de mRNA de Bcl-2 y FKBP38 de células PBMC tratadas con Dexametasona 1×10^{-10}

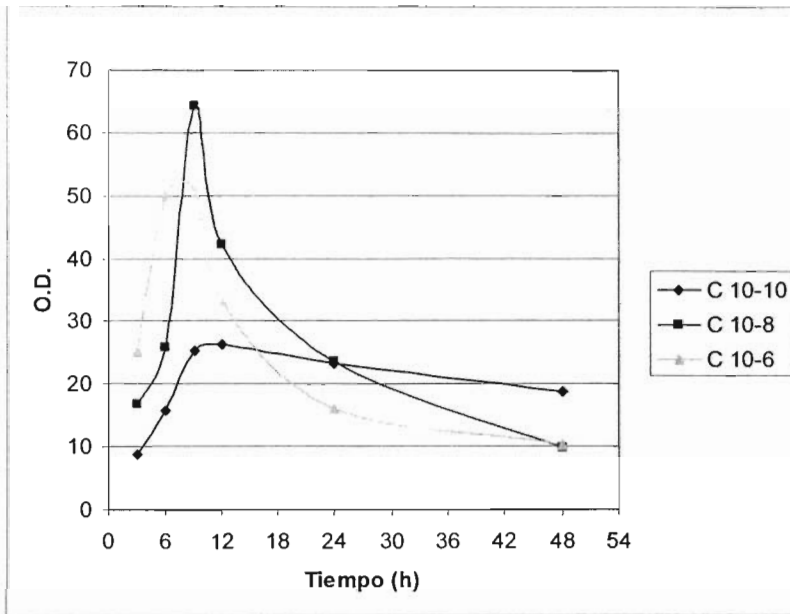


Fig. 27 Gráfica de la expresión de Bcl-2 a diferentes concentraciones de cortisol

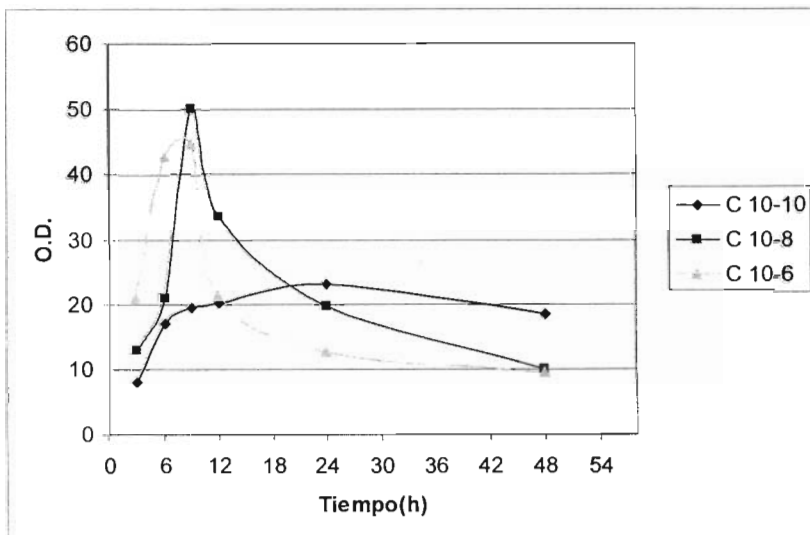


Fig. 28 Gráfica de la expresión de FKBP38 a diferentes concentraciones de cortisol

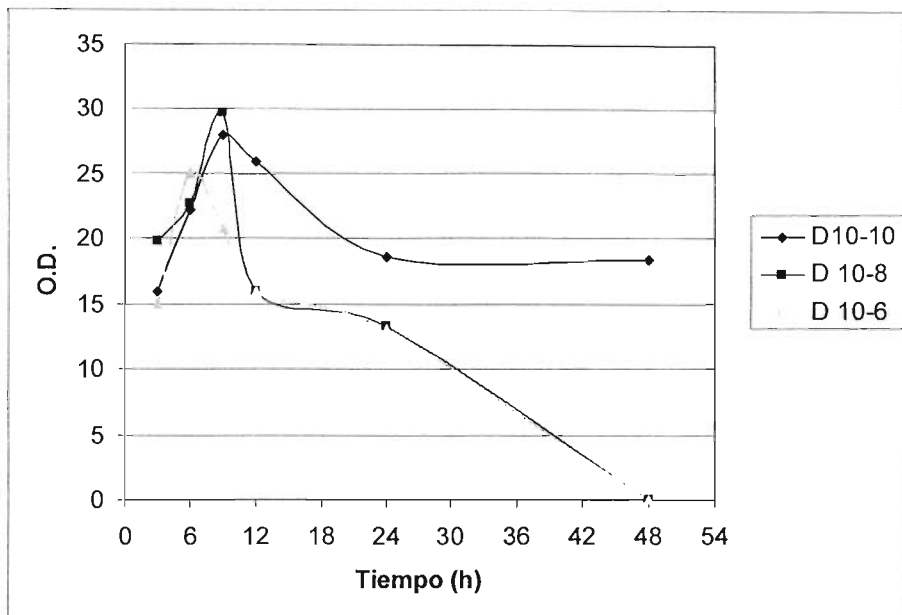


Fig. 29 Gráfica de la expresión de Bcl-2 a diferentes concentraciones de dexametasona

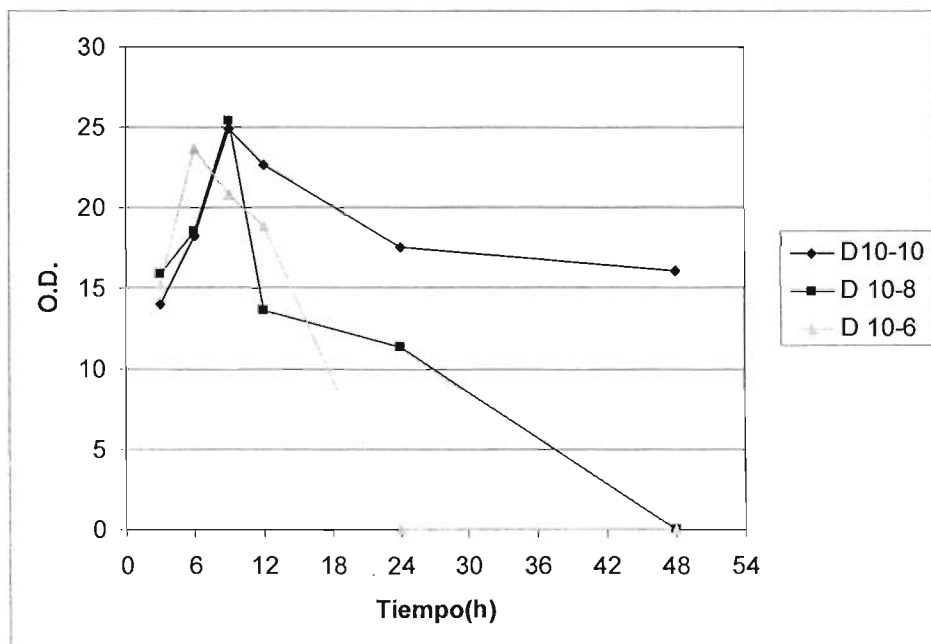


Fig. 30 Gráfica de la expresión de FKBP38 a diferentes concentraciones de dexametasona

Cabe señalar que el experimento se realizó dos veces y los valores numéricos de las densidades ópticas presentadas son promedio de estos dos, que sirven para su posterior análisis.

Las densidades ópticas obtenidas (O.D.) para las muestras que fueron tratadas con C+RU, D+RU y las de RU, se muestran en la Tabla 1 y 2 tanto para Bcl-2 como para FKBP38, donde notamos que las expresiones tanto de Bcl-2 y FKBP38, permanecen casi inalteradas comparadas con las células que no recibieron ningún tratamiento en particular (control), lo que nos permite asegurar que las variaciones en la expresión tanto de Bcl-2 y FKBP38 se deben principalmente al efecto del cortisol o en su defecto a dexametasona.

Al ver las densidades de las bandas correspondientes a la expresión de los genes de Bcl-2 y FKBP38 notamos que aun para las diferentes concentraciones tanto de dexametasona como de cortisol, el tiempo en se encuentra una mayor expresión de estas es alrededor de las 9h (Fig. 21-30).

Es de interés que en todos los casos las lecturas encontradas para la expresión de Bcl-2 son mayores que las encontradas para las de FKBP38 en las primeras horas (3-9h), es decir que independientemente de la concentración del glucocorticoide la expresión de Bcl-2 siempre será un poco mayor comparada con la de FKBP38.(Fig. 21-26)

Si observamos las Fig. 27 y 30 encontramos que la concentración a la cual Bcl-2 se expresa con mayor intensidad es 1×10^{-8} . Este comportamiento lo observamos de igual forma en la expresión de la inmunofilina FKBP38 (Fig. 28 y 30).

Podemos ver que el efecto provocado por el cortisol sobre la cantidad de mensajero es de mayor grado que el de la dexametasona, pues a las 9h la densidad óptica encontrada de Bcl-2 es de 64.343, mientras que las células tratadas con dexametasona presentan 29.675, lo mismo sucede en el caso de FKBP38 en donde la células que fueron tratadas con cortisol presentan una lectura de 50.128 comparado con las de dexametasona que dan una densidad de 25.352 .

De acuerdo con lo anterior encontramos que la expresión de FKBP38 desaparece por completo desde las 24 hrs, posteriormente a las 48h tampoco se encuentra la expresión de Bcl-2 (Fig. 24) a una concentración de 1×10^{-6} de dexametasona. Lo que podemos relacionar fácilmente con la Fig. 20 en donde tenemos que la mayor intensidad en las bandas de degradación del DNA que se detecta en ese mismo tiempo y a estas concentraciones, este hecho lo podemos vincular con lo reportado recientemente en la literatura, donde al no encontrarse expresada la molécula de FKBP38 las células se dirigen más rápidamente a un proceso apoptótico [75, 77], aun a pesar de que se encuentre expresada la molécula antiapoptótica Bcl-2.

Si bien al observar las escaleras de apoptosis presentadas para las diferentes concentraciones de glucocorticoides y tiempos de análisis de ellas (Fig. 19 y 20), es claro que cuando se va teniendo una disminución en la expresión de los genes de Bcl-2 y FKBP38 se va presentando una mayor intensidad en las bandas que corresponden a las escaleras de apoptosis, siendo que esto es más marcado cuando la expresión de FKBP38 desaparece por completo. Cuando las intensidades de las bandas de FKBP38 y Bcl-2 son más intensas (1×10^{-8} de dexametasona y cortisol), estas terminan por desencadenar el proceso de apoptosis, que podemos corroborar la fragmentación de su DNA.

Al parecer el efecto causado por la dexametasona, es más perjudicial para la célula ya que al ver el gel que corresponde a la escalera de apoptosis de esta, se encuentra que es más intensa que el mostrado para cortisol, coincidiendo con el hecho de que los genes que participan en la protección de la célula y que estamos detectando, son expresado en menor cantidad cuando utilizamos dexametasona que cuando se usa cortisol.

VI.- DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos y a las tendencias mostradas, es claro que la expresión de los genes Bcl-2 y FKBP38 es regulada por la dexametasona y por el cortisol de manera muy similar, pero hay que destacar el hecho de que quien tiene un efecto más nocivo es la dexametasona, ello es debido a que como se ha reportado en la literatura el efecto de esta última es mucho más potente que el de cortisol [80].

También es claro que las concentraciones del glucocorticoide utilizado van a afectar la expresión de Bcl-2 y FKBP38, podríamos relacionar este hecho con la cantidad de receptores de glucocorticoide presentes en la superficie celular, por ejemplo, puede ser que cuando se tiene una concentración muy alta de glucocorticoide estos presenten un fenómeno de resistencia asociado al receptor de glucocorticoide y a su concentración, y debido a esto no se tenga la mayor expresión de los genes en estudio en las primeras horas comparado con la concentración media (1×10^{-8}), que es en esta donde se tiene una mayor expresión. Mientras que en el caso de la concentración más baja (1×10^{-6}) notamos que se tienen comportamientos diferentes de acuerdo al glucocorticoide utilizado, pues al parecer en el caso de la dexametasona se presenta una expresión de los mensajeros muy similar al de la concentración de 1×10^{-8} ; y en el caso del cortisol la concentración de 1×10^{-10} es donde se tiene la expresión más baja de los mensajeros, y en este caso podríamos pensar que la cantidad de receptor unido a su ligando no es suficiente como para desencadenar una respuesta más amplia. Es pertinente señalar un posible estudio en el cual se detecten las cantidades y tipos de GR asociados a la expresión de Bcl-2 y de la inmunofilina FKBP38, con el fin de conocer un poco más acerca de los mecanismos por los cuales se está llevando a cabo la regulación de estos transcritos por los glucocorticoides ya que

como se menciono con anterioridad existen diversas formas en las que estos actúan, lo que es interesante de este trabajo es que efectivamente se encuentra una relación asociada a la concentración y tipo de glucocorticoide sobre la expresión de los mensajeros de Bcl-2 y FKBP38.

Una circunstancia de particular interés es que a la concentración de 1×10^{-6} de dexametasona la expresión de FKBP38 se encontró suprimida a las 24hrs, mientras que la de Bcl-2 aún se mantenía a este tiempo (claro que de manera más baja), pero no obstante a este tiempo también se detecta una intensidad fuerte en las bandas correspondientes a la degradación de DNA, lo que implica que la célula esta entrando en un estado apoptótico, podemos explicar este hecho con base en lo reportado en la literatura, donde se demuestra experimentalmente que sin la presencia de FKBP38, Bcl-2 no puede cumplir con su actividad antiapoptótica, ya que como se recordará Bcl-2 debe ser llevada por FKBP38 hacia la membrana mitocondrial externa para que esta funcione [75].

Por otra parte el hecho de estar teniendo una mayor expresión de Bcl-2 con respecto a la de la inmunofilina nos sugiere que el transporte de Bcl-2 a la membrana mitocondrial, es insuficiente, y que el remanente de Bcl-2 como se reporta en la literatura pudiera estarse acumulando en el núcleo [67], lo que llevaría aun más a la inactivación de NF κ B (ya que los glucocorticoides también intervienen en la inhibición de este factor) teniendo como resultado final la muerte de la célula. Quizás en este punto podría sugerirse un estudio donde se realicen determinaciones de la localización celular de Bcl-2, cuando las concentraciones de la inmunofilina son bajas.

Otra cuestión a analizar sería la cantidad exacta de mensajero relacionada con la cantidad de proteína traducida, ya que como se sabe existen ciertos mRNA que son estables y traducen para una cantidad mayor de proteína, comparado con otros en las que la cantidad de mRNA es proporcional a la cantidad de proteína, ya que si este fuera el caso del RNA mensajero de la

inmunofilina en estudio, los resultados obtenidos tendrían otra orientación diferente a las suposiciones hechas en los párrafos anteriores.

Así mismo sería interesante hacer estos mismos experimentos de manera cuantitativa, utilizando células de cultivo primario como las que se usaron en este trabajo, en comparación con líneas celulares, ya que como la literatura lo reporta sus parámetros de comportamiento son muy diferentes de acuerdo al fenotipo de la célula estudiado, ello con el objetivo de conocer un poco más acerca de los comportamientos de la inmunofilina así como de las moléculas antiapoptóticas.

VII.- CONCLUSIONES

Al aumentar las concentraciones de los glucocorticoides disminuye la expresión tanto de Bcl-2 como de la inmunofilina FKBP38. Lo que parece desencadenar el proceso apoptótico de una manera más rápida.

Las tendencias de expresión tanto de la inmunofilina como de Bcl-2 parecen ser muy similares ya que su máxima expresión se da a partir de las 9h. Siendo que la expresión de Bcl-2 la mayoría de las veces se manifestó con más intensidad que la de FKBP38.

Por otra parte se observó que al estar presente la expresión de Bcl-2 aunque sea con poca intensidad y en ausencia de la expresión de FKBP38, las células presentaron una mayor intensidad en la fragmentación de su DNA, lo cual sugiere que se necesita la participación de la inmunofilina a un concentración específica para que Bcl-2 pueda cumplir con su función antiapoptótica.

Cabe señalar que estos experimentos son una evidencia de cómo se encuentran altamente relacionadas a nivel de expresión de mensajeros tanto para FKBP38 y Bcl-2 ante un estímulo generado por los glucocorticoides. Estos resultados podrían servir de base para posteriores estudios en los que se debe determinar de manera cuantitativa la expresión del gen así como de la proteína, utilizando diferentes mecanismos inductores de muerte.

Concluyendo es pertinente decir que la FKBP38 al igual que sus congéneres desempeña una función bien importante en la homeostasis celular frente a agresiones endógenas, como

lo podría llegar a ser el cortisol en ciertas circunstancias, por su interacción con Bcl-2 que podría repercutir a su vez sobre otras moléculas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

VIII BIBLIOGRAFIA

- ¹ Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R.(2004). Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 11:S45-S55
- ² Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y, Saito H. (1997). Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(2):295-9
- ³ Pratt WB, Toft DO. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18(3):306-60.
- ⁴ Freeman BC, Yamamoto KR. (2002) Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science*; 296: 2232-5
- ⁵ Stavreva DA, Muller WG, Hager GL, Smith CL, McNally JG. (2004) Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes. *Mol Cell Biol.* 24:2682-97
- ⁶ Geley S, Figel M, Hartman BL and Kofler R (1996) Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 128: 1-97
- ⁷ Tuckermann J, Kleiman A, McPherson K, Reichardt H. (2005) Molecular Mechanisms of Glucocorticoids in the Control of Inflammation and Lymphocyte Apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 42(1):71-104
- ⁸ I. Segard-Manuel, K. Rajkowski, N. Jibard, G. Schweizer-Groyer, E.E. Baulieu, F. Cadepond. (1996) Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer-dimer equilibrium model. *Biochemistry* 35:1634
- ⁹ J.D. Schuetz, E.G. Schuetz, J.V. Thottassery, P.S. Guzelian, S. Strom, D. Sun. (1996) Identification of a novel dexametasona responsive enhancer in human CYP3A5 gene and its activation in human and rat liver cells. *Mol Pharmacol.* 49-63
- ¹⁰ Zhang G, Zhang L, Duff GW(1997).A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol* 16:145-52.
- ¹¹ Almawi, W. Y., Melemedjian, O. K. (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid anti-proliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 71, 9-15.

-
- ¹² Rabbit EH, Lavery GG, Walker EA, Cooper MS, Stewart PM, Hewison M. (2002) Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11 β hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *FASEB* 16:35-44.
- ¹³ Soufi M, Kaiser U, Scheneider A, Beato M, Westphal HM. (1995) The DNA and steroid binding domains of the glucocorticoid receptor are not altered in mononuclear cells of treated CCL patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 103: 175-183
- ¹⁴ Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD. (1999) The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Struct. Fold. Des.* 7:1135-43
- ¹⁵ Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 69:217-45.
- ¹⁶ A. Strasser, L. Connor, V.M. Dixit. (2000) Apoptosis Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69:217-4
- ¹⁷ Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. (2003) The CD95 type I/ typeII model. *Semin Immunol.* 15:185-93
- ¹⁸ Yin XM. (2000) Bid, a critical mediator for apoptosis induced by activation of Fas/TNFR1 death receptors in hepatocytes. *J. Mol. Med.* 78: 203-11.
- ¹⁹ Jäättelä M., Tschopp J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 4: 416-23
- ²⁰ Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. (2001) *Genes Dev.* 15: 2922-33
- ²¹ Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999) **BCL-2 family** members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13:1899-1911.
- ²² Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292:727-730.
- ²³ Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15:1481-1486.
- ²⁴ Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. (1999) Proapoptotic **Bcl-2** relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286:1735-1738.
- ²⁵ Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400:886-891.

-
- ²⁶ Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor R1/Fas death. *J Biol Chem*, 274:1156-1163.
- ²⁷ Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 301:513-517.
- ²⁸ Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA, Matsuyama S. (2003) . *Nat Cell Biol*, 5:320-329.
- ²⁹ Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC (2003) Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*, 423:456-461
- ³⁰ Ruffolo SC, Breckenridge DG, Nguyen M, Goping IS, Gross A, Korsmeyer SJ, Li H, Yuan J, Shore GC (2000) BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell Death Differ*, 7:1101-1108
- ³¹ Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ.(2001) BCL 2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8:705-711.
- ³² Ruffolo SC, Shore GC (2003). BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem*, 278:25039-25045.
- ³³ Kim PK, Annis MG, Dlugosz PJ, Leber B, Andrews DW(2004) During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol Cell* 14:523-529.
- ³⁴ Letai A, Bassik M, Walensky L, Sorcinelli M, Weiler S, Korsmeyer S(2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2:183-192.
- ³⁵ Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111:331-342.
- ³⁶ Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Bio*, 2:754-761.
- ³⁷ Frank S, Gaume B, Bergmann_Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*, 1:515-525
- ³⁸ Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinowich H, Amoscato AA, Yin XM (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell*, 15:3061-3072.

-
- ³⁹ Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2:55-67.
- ⁴⁰ . Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. 2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci*, 99:1259-1263.
- ⁴¹ Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ(2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2:55-67.
- ⁴² Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, 2:156-162.
- ⁴³ Zamzami N, Kroemer G: The mitochondrion in apoptosis (2001) How Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:67-71
- ⁴⁴ Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, O'Neil RG, McConkey DJ. (2002) Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem*, 277:20301-20308.
- ⁴⁵ Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*, 300:135-139.
- ⁴⁶ Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*, 162:59-69.
- ⁴⁷ Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. (2000) Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol*, 148:857-862.
- ⁴⁸ Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ.(2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol*, 159:931-938
- ⁴⁹ Amsterdam A, Sasson R (2002) The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*. 189(1-2):1-9
- ⁵⁰ Cidlowski, J.A, King KL, Evans Storms RB, Montage JW, Bortner CD (1996). The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog. Horm. Res*, 51: 457-490.
- ⁵¹ Mann, C.L., et al., 2001. Glucocorticoids regulate plasma membrane potential during rat thymocyte apoptosis in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 142:421-429.

- ⁵² Miyashita, T., Reed, J. C. (1992) Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* **52**: 5407–5411.
- ⁵³ Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Hamada, H. (2000) Adenovirus-mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **254**, 221–231.
- ⁵⁴ Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **75**: 229–240.
- ⁵⁵ Mok, C. L., Gil-Gomez, G., Williams, O., Coles, M., Taga, S., Tolaini, M., Norton, T., Kioussis, D., Brady, H. J. (1999) Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J. Exp. Med.* **189**:575–586.
- ⁵⁶ Rogatsky, I., Hittelman, A. B., Pearce, D., Garabedian, M. J. (1999) Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* **19**:5036–5049.
- ⁵⁷ Tonomura, N., McLaughlin, K., Grimm, L., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. (2003) Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J. Immunol.* **170**:2469–2478.
- ⁵⁸ Schmidt, M., Luger, N., Luger, A., Pauels, H. G., Schulze-Osthoff, K., Domschke, W., Kucharzik, T. (2001) Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J. Immunol.* **166**: 1344–1351
- ⁵⁹ Schmidt, M., H.-G. Pauels, N. Luegering, A. Luegering, W. Domschke, and T. Kucharzik. (1999). Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of interleukin-1b. *J. Immunol.* **163**:3484.
- ⁶⁰ Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., Korsmeyer, S. J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**:96–99.
- ⁶¹ Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., Korsmeyer, S. J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**: 886–891.
- ⁶² Hoijman, E., Rocha Viegas, L., Sarmiento, M. I., Rosenstein, R. E., Pecci, A. (2004) Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis by melatonin. *Endocrinology* **145**:418–425.
- ⁶³ Tan, Y. J., Teng, E., Ting, A. E. (2003) A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-xL can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-xL-overexpressing breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**:437–448.

-
- ⁶⁴ Wang, Z., Malone, M. H., He, H., McColl, K. S., Distelhorst, C. W. (2003) Microarray uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278:23861–23867.
- ⁶⁵ Chauhan, D., Hideshima, T., Rosen, S., Reed, J. C., Kharbanda, S., Anderson, K. C. (2001) Apaf-1/cytochrome C-independent and Smacdependent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* 276:24453–24456.
- ⁶⁶ Miyashita, T., Nagao, K., Krajewski, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Inoue, T., Yamada, M. (1998) Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 5:1034–1041.
- ⁶⁷ Gil-Gomez, G., Berns, A., Brady, H. J. (1998) A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 17: 7209–7218.
- ⁶⁸ Feinman, R. J., Koury, M., Thames, B., Barlogie, J., Epstein, J., Siegel, D. S. (1999) Role of NF- κ B in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood* 93:3044–3052.
- ⁶⁹ Massaad A. C., Portier P.B., Taglialatela G. Inhibition of Transcription Factor Activity by Nuclear Compartment-associated Bcl-2(2004). *J B C* 279(52):54470–54478.
- ⁷⁰ Almawi, W. Y., Abou Jaoude, M. M., Li, X. C. (2002) Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects. *Hematol. Oncol.* 20:17–32.
- ⁷¹ Almawi, W. Y., Hess, D. A., Rieder, M. J. (1998) Multiplicity of glucocorticoid action in inhibiting allograft rejection. *Cell Transplant.* 7: 511–523.
- ⁷² Distelhorst, C. W. (2002) Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 9 : 6–19.
- ⁷³ Galat A. (1993)Peptidylproline cis-trans – isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 216: 689-707
- ⁷⁴ W.B. Pratt, D.O. Toft. (1997) Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endoc. Rev.* 18(3): 306-360
- ⁷⁵ Liu I. (1991)Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes . *Cell* 66:807-815
- ⁷⁶ Sharkey I. Butcher, S.P.(1994) Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature* 371:336-339

-
- ⁷⁷ Lam E, Martin M. , Wiederrecht, G.(1995) Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene* 160:297-302
- ⁷⁸ Cong Bao Kang, Jeff Tai, Joel Chia, Ho Sup Yoon (2005) The flexible loop of Bcl-2 is required for molecular interaction with immunosuppressant FK-506 binding protein 38 (FKBP38) 579:1469–1476
- ⁷⁹ Shirane M, Nakayama KI.(2003) Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol.* 5(1):28-37.
- ⁸⁰ Weiwad M, Edlich F, Erdmann F, Jarczowski F, Kilka S, Dorn M, Pechstein A, Fischer G (2005). A reassessment of the inhibitory capacity of human FKBP38 on calcineurin. *FEBS Letters* 579: 1591–1596
- ⁸¹ Adrain C, Creagh EM, Martin SJ (2003). Defying death: showing Bcl-2 the way home. *Nat Cell Biol.* 5(1):9-11.
- ⁸⁰ Cevc G, Blume G. (2004) Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage *Biochimica et Biophysica Acta* 1663: 61– 73

APENDICE DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.

REACTIVOS

-Para cultivo

Medio RPMI 1840 SIGMA
Cortisol SIGMA
Mifepristone (RU486) SIGMA
Dexametasona SIGMA
NaCl Aldrich
KCl Aldrich
Na₂HPO₄ Aldrich
KH₂PO₄ SIGMA

-Determinación de la integridad de RNA

Agarosa GIBCO BRL
Formaldehído SIGMA
Acetato de Sodio SIGMA
EDTA SIGMA
MOPS SIGMA
Bromuro de Etidio SIGMA-ALDRICH

-Para la obtención de RNA total

Trizol GIBCO BRL
Cloroformo, sin aditivos SIGMA
Isopropanol para biología molecular SIGMA
Agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.01% v/v (DECP)
Etanol para biología molecular al 75% diluido con agua DEPC

- Reactivos para la obtención del DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total mediante RT-PCR

Oligo dT 50 μM
dNTPs 10mM
MuLV 10 mM (Enzima)

-Reactivos para PCR

Expand (mezcla de enzimas Taq y Pwo)
Buffer 10X con MgCl₂ 15 mM
dNTPs 10 mM
Iniciadores 5 μM

-Reactivos para Gel de agarosa

Tris base GIBCO BRL
Ácido Bórico SIGMA-ALDRICH

- Reactivos para fragmentación de DNA

Buffer de lisis

Tris GIBCO BRL
HCl GIBCO BRL
SDS
Proteínasa K

SOLUCIONES

-PBS 1x

137 mM de NaCl
2.7 mM de KCl
10mM Na₂HPO₄
2 m M KH₂PO₄

Se disuelven 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl , 1.44 g de Na₂PO₄, Y 0.24 G de KH₂PO₄ en 800ml dw agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl. Adicionar el agua necesaria pa ajustar 1 litro. Esta solución se esterilizo por filtración al vacío. Se almacena a temperatura ambiente.

-Amortiguador de corrida para ARN:
(cantidades para 2L de amortiguador 5)

Acetato de Sodio 50 Mm	1.6 L
EDTA 0.5M	20mL
MOPS	41.2 g
Agua libre de RNAsas	cpb 2L

-Amortiguador de carga para RNA

EDTA 1mM	49.5 % v/v
Glicerol	50 %
Azul de Bromofenol	0.35 % v/v
Xilencianol	0.25 % v/v
Agua desionizada estéril	

- TBE 5 X

54 g de Tris base
27.5 g de ácido bórico
20 ml de 0.5 M de EDTA (pH=8)
afora a 1 litro

ajusta el pH= 8.3

La solución 5X es más estable porque los solutos no se precipitan durante su almacenamiento. Cuando se utiliza se hace una dilución para tenerla 0.5X

- Buffer de lisis

50 mM Tris-Hcl pH=8
10 mM EDTA
200 mM NaCl
0.5 % SDS
0.5 mg /ml De pretinaza K (Boehringer-Mannheim)

- Tris-HCl (1M)

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de H₂O, adicionar 42 ml de HCl concentrado.

- Tris EDTA

10mM de Tris
1MM EDTA
pH=8

-Solución de Bromuro de Etidio (10mg / ml)

Adicionar 1g de Bromuro a 100 ml de H₂O, agitar durante varias horas hasta que este bien disuelto, cubrir el contenedor con papel aluminio, o transferir el líquido a una botella que lo proteja de luz, almacenar a temperatura ambiente.