



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES
INDUCIDOS POR HIPOXIA EN EL PROCESO DE
APOPTOSIS DE PBMC MEDIADO POR
GLUCOCORTICOIDES

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

BARRIENTOS TREJO ISAIAS



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

m347231



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente. Prof. Fernando García Tamayo
Vocal: Prof. Patricia Elvira Berron Ruiz
Secretario: Prof. Pedro Zamudio Cortéz
Primer suplente: Prof. Elena Zambrano González
Segundo suplente: Prof. Mónica Berenice Heras Chavarria

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Farmacología y Genética
Unidad de Investigación
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Asesor del tema:


Pedro Zamudio Cortéz

Supervisor técnico:


Gabriel Sandoval López

Sustentante:


Barrientos Trejo Isaías

PROLOGO

Es muy común que en estos espacios aparezca la frase mas leída en las tesis de la universidad "agradezco a..." o sus equivalentes. Pero a mi no se me da este tipo de redacción.

A veces he sentido la necesidad de preguntarle a Lucio Cabañas cuantos son el, o a Ernesto Guevara de la Serna con cuantos bastó para que se construyera al Che. Ha costado tanto trabajo llegar a entender que somos el constructo de un sin fin de individuos cercanos que se han visto relacionados a la vida de quien escribe estas líneas. Si pudiera apostar un centavo por cada ser vivo que me rodea en el tiempo y en la historia de mi formación físico-intelectual (sin la arrogancia de la percepción de estas palabras y en el mas estricto apego a la definición mas simple de estos dos tecnicismos, permitiéndome el abuso del lenguaje) no seria capaz de pagar, en caso de perder, en al menos siete vidas de trabajo permanente. Aquellos nombres que resuenan en nuestra mente por haber sido ilustres en su vida no son sino el conjunto de un sin fin de relaciones que les dieron la posibilidad de definirse. Es por esto que me siento en completa indefensión cuando me piden que agregue un agradecimiento y que me sienta orgulloso de "mi trabajo".

Este es un escrito que no dice algo mas allá de lo efímero de su información. La verdadera herencia que podemos dejar es el conocimiento de un individuo que tiene la obligación autoimpuesta de trascenderse a si mismo. Y aunque duele tanto la flagelación del conocimiento, es una apuesta a la que se decide entrarle conciente de que hemos de ceder, parcial o totalmente, una parte de nuestra naturaleza, para dar un paso en la dirección delimitada previamente. Por nosotros o por el entorno. Es ahí donde la apuesta se vuelve tramposa. No hay muchas opciones a menos que las podamos construir. Y esta construcción esta sujeta a las herramientas con que se cuenta. Las herramientas las otorga quien ya caminó por aquí antes y quien ya definió el camino. La brecha que se abre en este laberinto de conexiones es el

entendimiento que he asumido desde que logre comprender la sabiduría de una gran mujer: la escuela te instruye, la familia y el entorno te educan. La escuela te brinda herramientas, la educación te dicta como utilizarlas, ya sea para construir, para destruir o todo lo contrario. La libertad absoluta es casi imposible afirmar que existe.

El condicionamiento (biológico, social, cultural, conceptual, etc.) nos mantiene atados a la realidad construida por quienes ya anduvieron estos caminos. Es responsabilidad de todo aquel curioso picar piedra para asomarse a la vereda que nos permitirá sentir en la profundidad de nuestro ser la esencia de las cosas. Esta riqueza que se anhela no esta condicionada a lo perceptible de los sentidos, delimitados por las llamadas ciencias duras. Es una construcción que nos define a lo largo de la vida, y es ahí donde me detengo, y le hago una reverencia a todo aquel que se ha encontrado a mi lado para aportar una parte de lo que ahora soy capaz-incapaz de expresar. El entorno se ha vuelto cada vez más vacío en términos esenciales. Se ha desvirtuado la razón por la cual vivimos, la violencia y la agresión se manifiesta con mayor fuerza y en muchas ocasiones se vuelven una forma de vida. Hay un desgaste del modelo de organización social y del proceso civilizatorio que nos ha estado arrebatando la posibilidad de ser felices. Nos angustiamos día a día con la imposibilidad de manejar las complejas creaciones de las que somos rehenes e impulsores como especie. Concientes por la información con que contamos, o inconcientes por la aparente felicidad que nos otorga la ignorancia y la falta de capacidad para autodeterminarnos como individuos en la medida de lo posible. Nos sentimos dueños de la vida que no nos corresponde y los seres vivos estamos cada vez mas inmersos en resolver problemas que llevaran a mas problemas sin alcanzar a comprender que estamos totalmente distraídos de la verdadera naturaleza de las cosas.

Y a todo esto... ¿en que contribuye lo aquí presentado?

Entiendo que es formativo, pero... acaso no ocurre con una alta frecuencia que los conocimientos mas relevantes son producto de la manifestación mas grotesca del ser humano: la Guerra y la Violencia.

Y el estrés se generaliza.

Mi verdadera formación, aquella que le dio dirección a lo que se me brindó en las aulas, fue justamente fuera de ellas. Las relaciones de las cuales fui partícipe. Los actos que por convicción decidí asumir y que me enseñaron a conocer el mundo desde una óptica distinta. Hasta para eso alcanzo a dar la universidad. Incluso a pesar de sus administradores. Pero... ¿ para cuanto nos alcanzara la necesidad de ser consecuente con lo que se piensa? No me es posible visualizar el horizonte. Más sin embargo eso lo convierte en un reto interesante.

En cuanto a los referentes que hablan a través de mi, no es de extrañarse que el pilar mas firme sea una mujer: Juana trejo Arteaga, mi madre.

Es ella quien me ha dado la vida en toda la extensión de la palabra. No solo en el primer momento en que me atreví a echar un vistazo al quirófano, sino sobre todo me ha dado la vida día a día, segundo a segundo, a través todo el tiempo en que soy y que existo. Gracias a ella el concepto de realidad se ha vuelto una oportunidad para llegar a experimentar que se esta vivo. Posiblemente estemos aquí para venerar a quienes admiramos. Nuestra existencia dejara sentado el valor de su labor. La entrega es absoluta sin exigencia alguna. Tomamos lo que necesitamos y se nos entrega más de lo posible. No alcanza. Sin embargo ahí esta. La razón de vivir por y para los demás no se puede entender sin un poderoso referente como lo es mi madre, sabia en lo más elemental de la vida. A ella le debo las decisiones más acertadas y los respaldos mas fuertes para intentar mantener la utopía al borde de la realidad.

Y sin embargo la luz no se enciende tan solo con un interruptor. Una responsabilidad que da frutos a cada instante que se expresa, requiere de una gran preparación. Y en tanto José de Jesús, mi hermano mayor, mi parámetro de vida en muchos sentidos, siga siendo una autoridad que se gana el respeto a base de inteligencia y valor no hay posibilidad de concebirse vacíos de herramientas en la vida. No soy capaz de ir manifestar una alabanza superficial. Soy reflejo de mi

familia, Moisés, el hermano de la absoluta confianza en cualquier tema, el innovador que día a día nos sorprende. María Esther, solitaria y con un potencial envidiable por la capacidad de navegar a contracorriente. Maricruz, la cual nos ha hecho sentir que no podemos promover aquello que no somos capaces de impulsar en nuestro entorno más cercano, la justicia, la virtud, la verdad consigo mismo, la belleza en su esencia, el conocimiento, y demás condiciones que se necesitan para ser felices solo en el círculo diario de convivencia es posible hacer lo que tanto predicamos.

Gracias Yuvicela por lo que me has entregado. Gracias por ser quien eres y por acompañar mis desgarradas ideas. Sin ti soy el ayer.

En el tintero se queda tanto que se quisiera decir, pero por lo apresurado de nuestros días esto se convierte en un simple desahogo que quizá con los actos futuros se confirme.

INDICE

I. INTRODUCCION	2
II. ANTECEDENTES	6
2.1 GLUCOCORTICOIDES	6
2.1.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	9
2.1.2 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL	15
2.1.3 ANTAGONISTAS DE GLUCOCORTICOIDES.	15
2.2 INMUNOFILINAS	17
2.2.1 FKBP 52	17
2.2.1.1 ESTRUCTURA	19
2.2.1.2 FUNCIÓN BIOLÓGICA	23
2.2.2 FKBP 51	25
2.3. HIPOXIA	32
2.3.1 HIPOXIA Y APOPTOSIS	33
2.3.2 FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA 1 (HIF-1)	33
2.4. APOPTOSIS	36
2.4.1 NECROSIS-APOPTOSIS.	36
2.4.2 MECANISMO	37
2.4.3 EFECTORES INTRACELULARES	37

2.4.4 REGULADORES INTRACELULARES	39
2.4.5 REGULADORES EXTRACELULARES	41
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	43
3.1 OBJETIVOS	43
3.2 HIPÓTESIS	44
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	46
4.1 CULTIVO CELULAR	47
4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	52
4.3 ENSAYO DE INTEGRIDAD DEL RNA	54
4.4 OBTENCIÓN DEL CDNA COMPLEMENTARIO	55
4.5 GEL DE AGAROSA	57
V. RESULTADOS	59
5.1 DETERMINACION DE mRNA EN GEL DE AGAROSA	59
5.2 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA (DENSIDAD OPTICA)	61
VI. DISCUSION	74
VII. CONCLUSIONES	82
VIII. BIBLIOGRAFIA	85

ABREVIATURAS

GC	GLUCOCORTICOIDES
HPA	EJE HIPOTALAMO PITUITARIA ADRENAL
GR	RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES
GRE	ELEMENTO DE RESPUESTA A GLUCOCORTICOIDES
nGRE	GRE NEGATIVO
PBMC	CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA
DEX	DEXAMETASONA
AF-1	FACTOR ACTIVADOR 1
DBD	DOMINIO CENTRAL DE UNION A DNA
LBD	DOMINIO DE UNION A LIGANDO
NLS	SEÑALES DE LOCALIZACION NUCLEAR
TIF	FACTOR INTERMEDIARIO TRANSCRIPCIONAL
HSP	PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO
P23	PROTEINA DE BAJO PESO MOLECULAR
HAT	COACTIVADOR CON ACTIVIDAD HISTONA ACETILASA
BTM	MAQUINARIA DE TRANSCRIPCION BASAL
IL-1	INTERLEUCINA 1
MAPK	PROTEINA CINASA ACTIVADA POR MITOGENO
MKP	MAPK FOSFATASA
CSF	FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS
NFκB	FACTOR DE TRANSCRIPCION NUCLEAR KAPA DE CEL. B

iNOS	OXIDO NITRICO SINTETASA INDUCIBLE
COX	CICLO OXIGENASA
ICAM-VCAM	MOLECULAS DE ADHESION
TNF	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
RU486	FARMACO MIFEPRISTONA. ANTAGONISTA DE GC
FKBP	PROTEINA DE UNION AL INMUNOSUPRESOR FK-506
PPIasa	ACTIVIDAD PEPTIDIL-PROLIL ISOMERASA
TPR	REPETICION DEL TETRATRICOPEPTIDO
PR	PROGESTERONA
HBI	INMUNOFILINA UNIDA A PROTEINA DE CHOQUE TERMICO
ssD-BP	PROTEINA UNIDA A LA SECUENCIA D DE LA SEGUNDA CADENA DEL GENOMA DE ADENOVIRUS
CK	CASEINA CINASA
CaM	CALMODULINA
TC-PTP	PROTEINA TIROSIN FOSFATASA DE LA CELULA T
HIF	FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA
p-VHL	PROTEINA PRODUCTO DEL GEN SUPRESOR DEL TUMOR VON HIPPEL LINDAU
VEGF	FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR
ODD	DOMINIO DE DEGRADACION DEPENDIENTE DE OXIGENO
IRES	SECUENCIA INTERNA DE ENTRADA AL RIBOSOMA
HRE	ELEMENTO DE RESPUESTA A HIPOXIA EN EL GENOMA
PCR	REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

I

INTRODUCCION

- El aprender muchas cosas no instruye la mente.
- Pues la verdadera y única sabiduría es conocer la mente, que puede disponer o gobernar todas las cosas por medio de todas las cosas.
- Ninguno de nosotros sobresalga en merecimientos; si hay alguno, váyase a otra parte y este con otros.

HERÁCLITO

I. INTRODUCCION

Los glucocorticoides tienen un papel muy importante en la regulación del sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmune. Bajo condiciones de estrés psicológico se manifiesta un equilibrio que permite la estabilidad del organismo. Cuando el sistema endocrino se altera, la liberación de hormonas amplifica el efecto sobre el sistema inmune. La señalización de muerte o sobrevivencia controlada por la liberación de moléculas asociadas a estrés amortiguan el efecto o lo amplifican. El estudio de dichas moléculas nos acerca a la posibilidad de manejar condiciones mínimas de control, por métodos no invasivos, para evitar el desgaste celular y la muerte.

Los glucocorticoides, siendo moléculas efectoras del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenales son hormonas que participan en rutas de señalización del sistema endocrino por medio de las cuales se manifiestan un conjunto de efectos fisiológicos en el organismo. Para entender mejor como se lleva a cabo dicha señalización intracelular es necesario trabajar en un modelo que nos permita una mejor comprensión acerca de la relación que existe entre los glucocorticoides y sus receptores. Debido a que los receptores están regulados por moléculas asociadas, o por rutas que parecieran no estar vinculadas en forma directa, es que se plantea la necesidad de buscar información que nos acerque a la dinámica de comportamiento de este complejo receptor y sus proteínas regulatorias.

Bajo condiciones de estrés, se liberan glucocorticoides, y se requiere de una alta cantidad de oxígeno para la producción de energía que mantenga las funciones del organismo. Esta necesidad produce un gasto del oxígeno disponible lo cual puede generar periodos de carencia de oxígeno menores al 5%, mejor conocido como hipoxia. La hipoxia es una de las condiciones que se le presenta a la célula para inducir sobrevivencia, o en algunos casos muerte, por carencia de oxígeno. El marcador de hipoxia más estudiado, el complejo HIF-1, al ser un factor de transcripción, induce la síntesis de gran cantidad de moléculas que permitirán a la célula presentar una respuesta a hipoxia. Este dímero inicia síntesis de moléculas que participarán en rutas vinculadas al abastecimiento de nutrientes celulares. Es por lo anterior que comúnmente se estudia en células tumorales.

En pacientes bajo condiciones de estrés medioambiental inducido por ansiedad o con depresión se sabe que hay regulación de muerte celular debido a desordenes metabólicos en suministro energético por glucosa o lípidos, y el cortisol es un inductor de este proceso. Un par de moléculas que participa en la regulación del receptor de glucocorticoides son las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 debido a que se asocian al receptor formando un complejo que puede ser activado vía la unión a su ligando hormonal, el glucocorticoide. Se sabe que el factor HIF-1 regula la señalización para transcribir receptor de glucocorticoides. Lo que no se ha estudiado es si el receptor, en respuesta a la concentración de glucocorticoides y a las condiciones adversas de muerte celular, regula la transcripción de la subunidad del factor de transcripción HIF-1 α .

El presente trabajo busca ser el punto de partida para entender la regulación de dos factores, o coactivadores, de la transcripción, que al ser activados inician la expresión de un gran número de moléculas relacionadas con muerte o supervivencia. Se plantea hacer una cinética de estudio de las moléculas HIF-1a, FKBP51 y FKBP52, utilizando diferentes concentraciones de cortisol y dexametasona como estímulo sobre cultivo primario de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC), lo cual nos permitirá acercarnos a una mayor comprensión de los ciclos de regulación hormonal, dado por glucocorticoides, bajo condiciones de estrés psicológico.

II

ANTECEDENTES

Hasta el más valiente de nosotros pocas veces tiene el valor para enfrentarse con lo que realmente sabe...

¡No seamos cobardes con estos actos, ni los rechacemos después de realizados!
El remordimiento de conciencia es algo indecoroso.

Desconfío de todos los sistemáticos y me alejo de ellos. El ansia de sistema constituye una falta de honradez.

Que quede dicho que, de una vez por todas, hay muchas cosas que no quiero saber. La sabiduría marca unos límites incluso al conocimiento

Para vivir sólo hace falta ser un animal o un dios, dice Aristoteles. Falta una tercera condición: hay que ser ambas cosas, es decir, un filósofo...

El Ocaso de los Idolos
Friedrich Nietzsche.

II. ANTECEDENTES

2.1 GLUCOCORTICOIDES

Los Glucocorticoides (GC) son secretados por las glándulas adrenales¹ y actúan como efectores periféricos del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), con una actividad esencial en la respuesta al estrés y a la regulación homeostática. La exposición a factores estresantes activa una gran variedad de sistemas fisiológicos, como es el eje HPA, el cual puede ser estimulado por diversas estructuras limbicas del cerebro^{2 3}, por componentes del sistema inmune y por inervaciones del sistema nervioso^{4 5}.

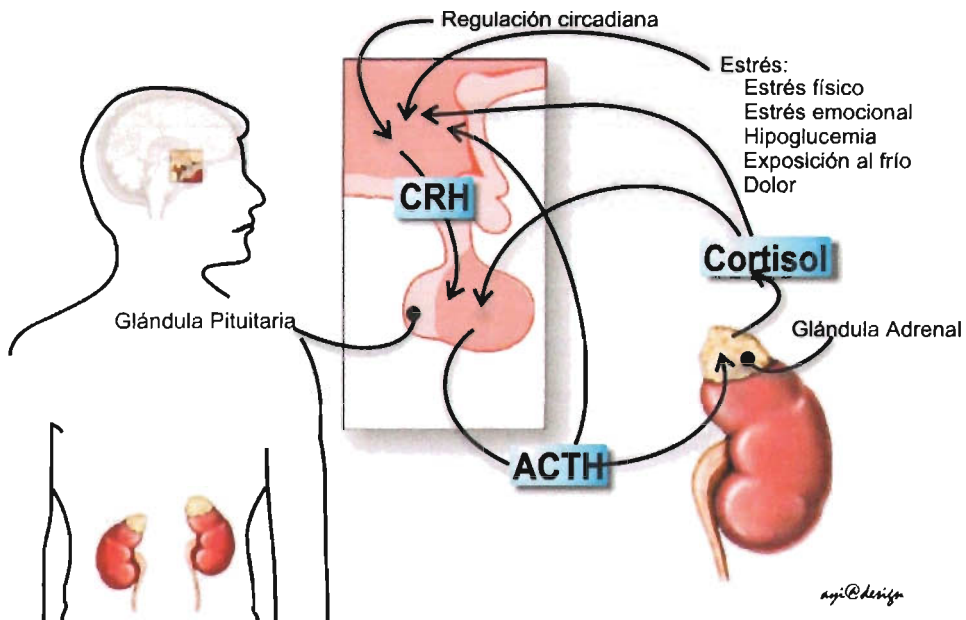


Figura 2.1. Representación esquemática del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

En cuanto al sistema inmune, durante la inflamación, los linfocitos y los macrófagos activados secretan citocinas inflamatorias, como son IL-1- β , IL-6 ò TNF- α . Estas citocinas no solo actúan fuera del SNC como

componentes inductores de las reacciones inflamatorias, sino que también inducen la expresión y liberación hipotalámica de Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH).

Tabla 2.1. Efectos de Glucocorticoides en Apoptosis

Mecanismo	Sistema celular	Apoptosis	Modo de Acción
Modulación de genes tempranos	Timocitos de rata ⁶	P	La interferencia entre AP-1 y GR en la unión al GRE
	Linfocito T ⁷	P	Mediado por c-Fos
	Glándula mamaria ⁸	A	Una inducción de la proteína cinasa de A, actividad de unión AP-1 ADN y elevados niveles de mRNA de c-Fos, JunB, y JunD
Modulación de los genes de la familia Bcl-2	Línea celular TMK-1 de cáncer gástrico humano ⁹	A	Modulación de expresión del gen de bcl-x: la supresión de Bcl-xS y aumentando el nivel basal de Bcl-xL
	Líneas celulares de Hepatoma ¹⁰	A	Inducción de Bcl-xL
	Sobre expresión de Bcl-2 de linfocitos T. ¹¹	A	Sobre expresión de Bcl-2
	Células granulosa ¹²	A	Elevación de Bcl-2
Modulación de otros genes de supervivencia	La célula del epitelio pulmonar ¹³	A	Inducción de cIAP-2
	Las células de hepatoma de rata (HTC) ¹⁴	A	Activación de NF_κB
La modulación de señales de transducción	Células de Mieloma ¹⁵	P	Disminución de la regulación de las actividades de MAPK
	Células Mononucleares de Sangre Periférica humana (PBMCs) ¹⁶	A	Supresión de blastogénesis de PBMC inducido por mitogeno
	Eosinófilos humanos ¹⁷	A	Activación de JNK y p38 MAPK
Todavía no ha sido identificado	Osteoblastos (MC3T3E) ¹⁸	A	Activación de JNK/SAPK bloqueando
	Líneas celulares de Leucemia Aguda Mieloide ¹⁹	P	No esta completamente entendido. Bcl-2 y c-myc estaban inalterados
	Timocitos ²⁰	P	Alterando el potencial de membrana plasmática
	Células del endotelio glomerular bovino ²¹	A	Inhibición de caspasa-3 así como la activación de proteasas
	Linfocito B ²²	P	No esta totalmente caracterizado
	Monocitos Humanos ²³	P	No esta totalmente caracterizado
	Placenta de rata ²⁴	P	No esta totalmente caracterizado
	Neutrófilos humanos ²⁵	P	No esta totalmente caracterizado

A, efecto anti-apoptótico;

P, efecto pro-apoptótico.

Sin asterisco, Modulación de apoptosis por Dexametasona (Dex).

a También con prednisolona.

b También con hidrocortisona.

c También con flucinolona, prednisolona y corticosterona.

La CRH incrementa la producción de hormona adrenocorticotropica (ACTH, también conocida como corticotropina), por las células corticotrópicas de la pituitaria, que estimula células de la corteza adrenal para sintetizar y secretar glucocorticoides²⁶.

Los Glucocorticoides promueven efectos antiinflamatorios por que reducen la actividad de algunos tipos celulares como son células T, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliales y epiteliales. Los glucocorticoides completan estas acciones que interrumpen la inflamación, a través de las rutas mediadas por citocinas que inducen la apoptosis en células del sistema inmune. La respuesta o sensibilidad a glucocorticoides ha sido vinculada a diversos factores, sin embargo la hipersensibilidad o hiposensibilidad está determinada por diferencias interindividuales en la respuesta celular a glucocorticoides^{27 28}. Los glucocorticoides ejercen efectos inhibitorios sobre la respiración celular^{29 30}, y llevan a cabo su acción biológica vía la interacción citoplasmática con el receptor de glucocorticoides (GR).

Tabla 2.2. Actividad de proteínas inducidas por Glucocorticoides^{31 32}

<u>Proteínas con potencial anti-inflamatorio</u>	<u>Proteínas con potencial pro-inflamatorio</u>
Anexina-A1	Receptores de Quimiocinas CCR1 y CCR2
Receptor b2-adrenergico	Componentes del Complemento C1q, C3 y C5
Proteína de célula clara	Receptores de Complemento C3aR1, CR2 y C5aR1
GILZ	IL-1 receptor-1
HbSR CD163	Receptor de IL-8
IκB	Receptor de Interferón-γ
IL-10	receptor II de Interferón-γ
Receptor de IL-10	Factor inhibitorio de migración del Macrófago
IL-1 receptor-2 (IL-1 receptor señuelo)	Metaloproteinasas 7, 10, 16 y 19 de la matriz
MPK-1	Trombospondinas 1, 2 y 4
Factor de Crecimiento Transformante-b3	Receptores de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (incluyendo G1TR)

Los efectos diferenciales dependen de los ligandos sintéticos, de los ligandos endógenos o del estado en que se encuentre el proceso inflamatorio³³.

2.1.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

Los GR's han sido ampliamente estudiados. Después de su unión a su ligando específico, la interacción de los GR's con diversas moléculas ha llevado a utilizar diversas estrategias que faciliten clasificarlos en cuatro grandes grupos³⁴:

- La relación entre la estructura del GR y su función en términos de unión a ligando y la interacción con otras moléculas accesorias
- Definir la importancia relativa de la transactivación, transrepresión y depresión mediada por GR en el contexto del receptosoma emergente de glucocorticoide
- Estudiar los rápidos efectos “no genómicos” de estos compuestos que no se involucran directamente con la maquinaria genómica.
- Identificar proteínas inducidas por glucocorticoides con regulación de actividades antiinflamatorias.

Los GR forman parte de una gran superfamilia de receptores que incluye receptores para hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos, y progestinas), mineralocorticoides, hormonas tiroideas, y vitamina D. La hormona unida a su receptor lo activa resultando en la unión a DNA vía estructuras conservadas con dedos de zinc y activación de genes blanco³⁵.

Existen dos isoformas del GR: GR α y GR β . El GR α esta compuesto de 777 aminoácidos, un sitio de unión a hormona y un sitio de activación por glucocorticoides. El GR β consiste en únicamente 742 residuos, y su función aún no esta clara, pero podría actuar como un regulador negativo

de la transactivación mediada por GR α y posiblemente regule la resistencia a glucocorticoides durante la respuesta inflamatoria³⁶.

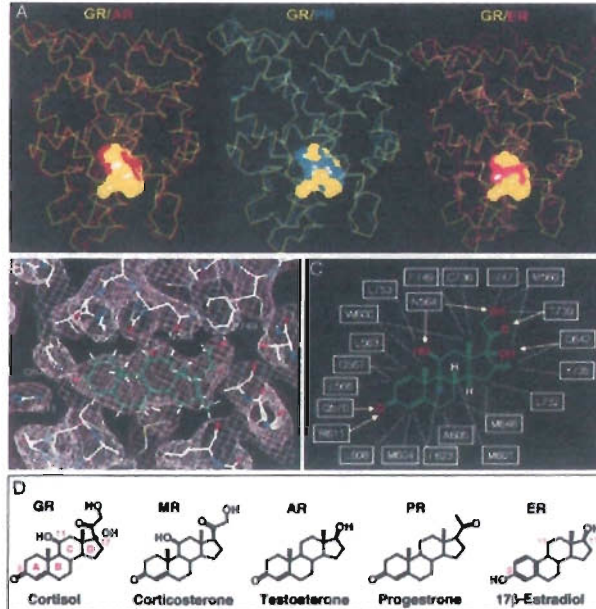


Figura 2.2 . Base molecular de Reconocimiento del Ligando por GR. (A) Sitio de unión a ligando del GR y una comparación entre los sitios de unión a AR, PR, y ER. GR está coloreado en amarillo los tres modelos. (B) se muestra el mapa de la densidad electrónica de la interacción entre dexametasona y los residuos circundantes del GR. (C) Representación esquemática de las interacciones entre GR y dexametasona. Los puentes de hidrógeno son indicadas por flechas sólidas y las interacciones hidrófobas son indicadas por líneas punteadas. (D) Estructuras Químicas de las hormonas esteroideas endógenas y la enumeración de los anillos y átomos importantes³⁷.

El GR α es expresado en casi todos los tipos celulares de mamífero.

Se compone de tres dominios:

1. El dominio de transactivación N-terminal incluido el dominio de activación o factor activador 1 (AF-1) requerido para el corte transcripcional y la asociación del receptor con los factores de transcripción basal³⁸.
2. El central, el dominio de unión a DNA (DBD, por DNA binding domain), está altamente conservado en sus receptores nucleares.

Este consiste en dos regiones con dedos de zinc los cuales son críticos para la dimerización y unión al blanco.

3. El C-terminal es el sitio de unión a hormona, y también sirve como sitio de unión a las proteínas de choque térmico (HSP). Este dominio de unión a hormona contiene señales de localización nuclear, como es el dominio de AF-2 con función de activación dependiente del ligando^{39 40}.

Organización Estructural de la Proteína hGR α

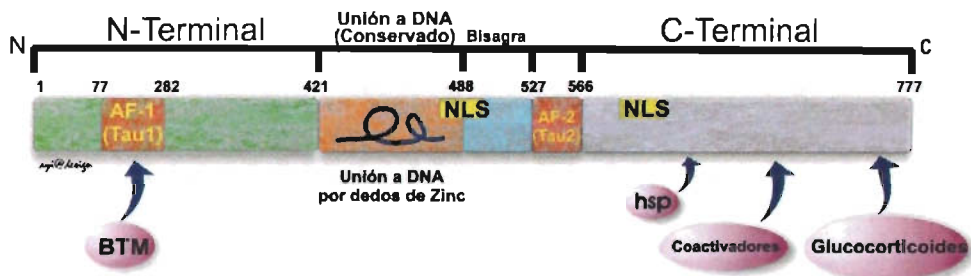
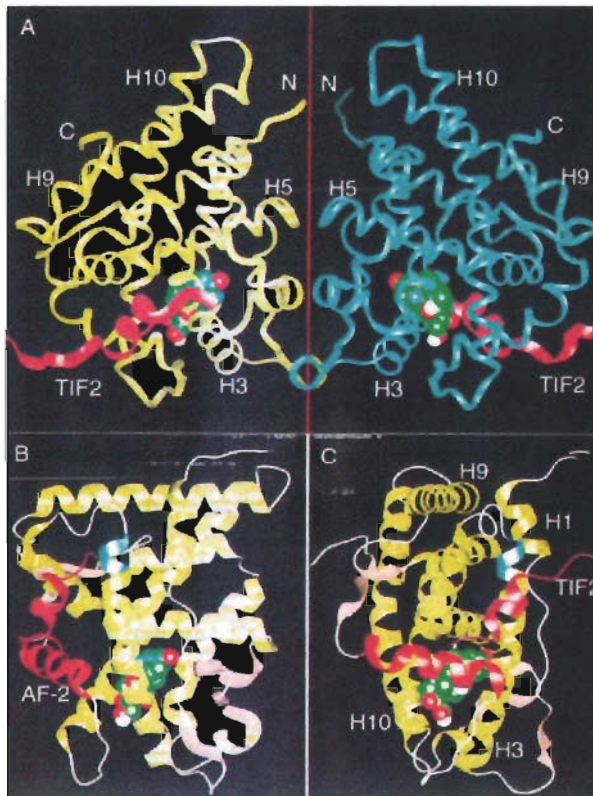


Fig. 2.3. Organización de la proteína GR α . La proteína GR α cuenta con tres principales dominios, mostrados de izquierda a derecha. El dominio de transactivación N-terminal contiene el dominio de activación AF-1, ó *tau1*, que es requerido para potenciar la actividad transcripcional y la asociación con la Maquinaria Basal de Transcripción (BTM). El dominio central de unión a DNA esta altamente conservado y contiene dos regiones críticas con dedos de zinc para la dimerización al receptor y la unión al blanco. El dominio C-terminal de unión a la hormona sirve como un sitio de unión de las Proteínas de Choque Térmico (HSP90 Y HSP70 e Inmunofilinas) y coactivadores, y contiene Señales de Localización Nuclear (NLS), como son los ligandos con función dependiente del dominio de activación (AF-2 ó *tau2*).^{6 41}

En el modelo clásico de activación de GR, los glucocorticoides lipofílicos pasan a través de la membrana plasmática de las células e interactúan con GR's citoplasmáticos. Los receptores que se encuentran en citoplasma están asociados a complejos, compuestos por chaperonas o proteínas de choque térmico HSP90^{42 43 44}, HSP70, HSP40, una proteína de bajo peso molecular (p23), y algunas inmunofilinas (FKBP), los cuales regulan el enlace y la retención con el ligando^{45 46}. Se asocia con una inmunofilina, dos chaperonas y la proteína p23. De la relación que se

presenta entre estas proteínas depende la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides. Algunas favorecen su actividad estimulándola, otras lo que promueven es que no exista una disociación del complejo, lo que lleva a que se presente inactividad por carecer de la conformación adecuada para traslocar a núcleo e iniciar la expresión de genes blanco.

Figura 2.4. Estructura del Complejo GR/Dex/TIF2 (Factor Intermediario Transcripcional, conocido también por NLS o señales de localización nuclear). (A) Arreglo global del dímero GR-LBD (dominio de unión a ligando). Los dos LBDs se muestran en amarillo y azul; los dos péptidos de TIF2 están en púrpura; y las dos moléculas de Dexametasona están llenando el espacio con la representación del carbono, oxígeno e hidrógeno de colorar verde, rojo, y blanco,



respectivamente. El eje de simetría C2 se muestra en rojo. (B y C) Dos vistas a 90 grados del complejo monómero compuesto por GR/Dex/TIF2 dónde las hélices están coloreadas en amarillo y las cadenas β están en oro. La hélice de AF-2 está en rojo y el residuo del Lisina que forma la hélice 3 está en azul. Los péptidos de TIF2 se muestran en púrpura.

Al GR se le localiza en un continuo tránsito entre el núcleo y el citoplasma^{47 48 49 50} por lo que la liberación subsecuente de moléculas chaperonas asociadas como complejo a los GR y los eventos de fosforilación resultan en la homodimerización del complejo ligando receptor (GC-GR α) y la trans migración al núcleo celular. Los dominios de la porción N-terminal del receptor interactúan con el Elemento de Respuesta a Glucocorticoides (GRE), de forma positiva o negativa, que se encuentra en la región promotora de los genes blanco en el DNA, con el consecuente inicio o represión de la expresión y posible transcripción de dichos genes⁵¹. La redistribución citoplasmática del GR se recicla en función a la unión al ligando o a la degradación por el proteasoma⁵².

El DBD central está compuesto por dos regiones con dedos de zinc altamente conservados. La primera región de dedos de zinc es la responsable del reconocimiento de los sitios blanco, siendo tres residuos los que regulan la “caja P”, responsable de la discriminación del elemento de respuesta. La segunda región con dedos de zinc estabiliza las interacciones proteína-DNA, y contiene la “caja D”, región crítica para la dimerización del receptor.

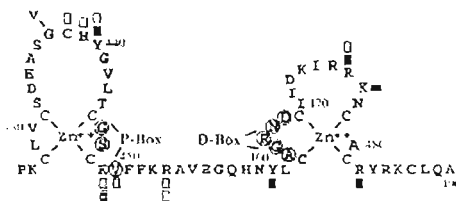


Figura 2.5. Representación esquemática de los dedos de zinc DBD⁵³.

La secuencia consenso del GRE es un sitio palindrómico de 15 pares de bases AGAACAnnnTGTTCT (donde n es cualquier nucleótido)⁵⁴. Tanto el número de GRE's como la relativa proximidad con la caja TATA parecen ser determinantes de la expresión de genes inducidos por glucocorticoides⁵⁵.

La unión de GRE-GR α resulta en un cambio conformacional en GR α que promueve el reclutamiento de diversos coactivadores para el complejo GR α -DNA⁵⁶. Estos coactivadores contienen actividad histona acetilasa (HAT) cuando parece ser crítico el remodelamiento de la estructura de la cromatina y al presentarse profundas manifestaciones por efecto del cortisol. La acetilación de histonas resulta en un rearrreglo nucleosomal y un desplegamiento para permitir el acceso de la maquinaria de transcripción basal (BTM) al promotor.

El acceso de los promotores y el rearrreglo nucleosomal pueden también ser acompañados vía otros factores que no contienen HAT⁵⁷. Los glucocorticoides incrementan la síntesis de ciertas proteínas antiinflamatorias, como son Lipocortina 1, inhibidor leucoproteasa sérica, receptor antagonista de IL-1, Endopeptidasa neural, y Proteína Cinasa Activada por Mitógeno (MAPK) Fosfatasa 1 (MKP-1)^{56 58}, presumiblemente por la activación del gen dependiente de GRE.

2.1.2 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL

El GR α puede reprimir genes directamente uniéndose a un GRE negativo (nGRE) cuya secuencia es altamente variable, resultando en diversos mecanismos de represión regulada por nGRE.

También se ha observado que regula genes involucrados en la respuesta antiinflamatoria. En contraste, el más potente efecto antiinflamatorio aparece al presentarse la interacción proteína-proteína entre GR α y otros factores de transcripción, particularmente NF κ B y AP-1. Estos mecanismos reprimen la producción de un número de citocinas que son relevantes para las enfermedades inflamatorias, como son IL-1B, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, GM-CSF, y TNF- α . Además, diversas quimiocinas incluidas eotaxina, MIP, RANTES, algunas enzimas como son iNOS, y COX-2, y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM son reguladas de esta manera⁵⁹.

2.1.3 ANTAGONISTAS DE GLUCOCORTICOIDES.

La transactivación genética ha sido explicada por un cambio en la estructura del receptor nuclear que permite el reclutamiento de un coactivador. El complejo receptor coactivador promueve la acetilación de las histonas y lleva a preparar los promotores del gen blanco para la transactivación por condensación de la correspondiente cromatina.

La Ciproterona es clínicamente usada como un antiandrógeno para cáncer de próstata inoperable, síndromes virilizantes en mujeres y la

inhibición del impulso sexual masculino. Con propiedades farmacológicas similares, el fármaco antiprogéstina, mifepristona ó RU486, revela una mayor potencia que ciproterona para prevenir respuestas a la transactivación del Receptor de Glucocorticoides inducido por Dexametasona y transrepresión del Factor Nuclear κ de células B (NF κ B).

A

B

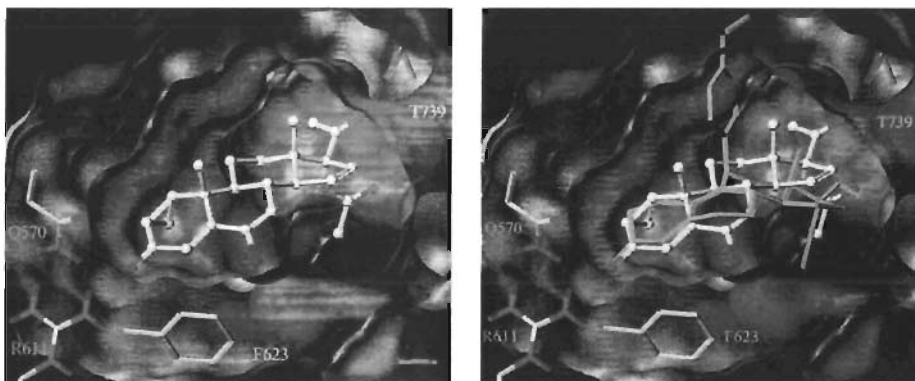


Figura 2.6. Determinación estructural de antagonismo en GR.

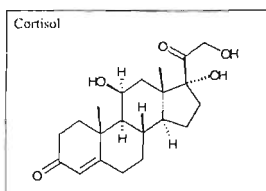
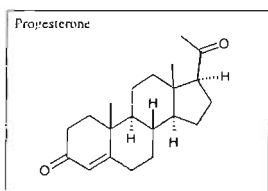
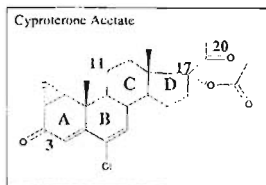
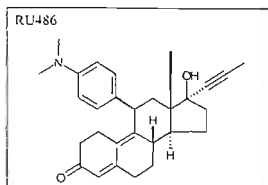
A) Modelo homólogo del GR con la estructura de Acetato de Ciproterona al interior.

B) Representación coordinada de la estructura de RU486 (en amarillo) y Ciproterona (en blanco) al interior del modelo homólogo del GR⁶⁰.

Tanto Ciproterona como RU486 son caracterizados como antagonistas competitivos de Dexametasona a través de sus propiedades intrínsecas de transactivación en hepatocitos de rata⁶⁰, particularmente por Dexametasona.

El antiprogéstano más ampliamente utilizado para evaluar la actividad de glucocorticoides, Mifepristona ó RU486, fue originalmente desarrollado como un anti-glucocorticoide. Posteriormente se demostró

que reprime la transactivación mediada por el Receptor de Glucocorticoides^{61 62}.



2.2. INMUNOFILINAS

2.2.1 FKBP 52

FKBP52 pertenece a una subclase de proteínas conocidas como inmunofilinas, que unen a FK506 (FKBPs), basadas en su capacidad de ligar a la droga inmunosupresora FK506. El sitio de unión de FKBP52 a FK506 contiene actividad Peptidil-Protil *cis-trans* Isomerasa (PPIase). PPIase (también conocido como actividad rotamasa) es una función chaperona que cataliza la conversión de los enlaces protil péptido de *trans* a *cis* prolin, a menudo un paso limitante de velocidad en el plegamiento de la proteína⁶³. El dominio activo de PPIase comparte un 55% en la secuencia con su homólogo más pequeño, pero mejor estudiado, FKBP12⁶⁴. FKBP52 fue descubierto, no como proteína chaperona solitaria, si no como un componente no ligado a la interacción con el

heterocomplejo, una interacción del receptor esteroide que se lleva a cabo a través de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Desde entonces, un número de inmunofilinas de gran peso molecular (FKBP52, FKBP51, y Cyp40) han sido identificadas más por sus capacidades de unir a Hsp90 vía dominios de Repetición del Tetratricopéptido (TPR) que por actividades chaperoninas individuales. Desde su descubrimiento en 1985, a FKBP52 se le nombraba de diferentes formas.

Faber y sus compañeros de trabajo fueron los primeros en encontrar FKBP52 mientras desarrollaban un anticuerpo para el epítopo EC1 del complejo receptor de la progesterona 9S (PR) del útero de conejo^{65 66}. EC1 resultó estar en una proteína de 59-kDa que une a Hsp90, inicialmente llamada p59 por el laboratorio de Faber⁶⁷. Además de PR, p59 fue encontrado como parte de los complejos esteroideos no transformados del estrógeno (ER), el andrógeno (AR), y los Receptores de Glucocorticoides (GR)^{68 66}. Usando el anticuerpo anti-EC1 de Fabers, Sánchez descubrió una proteína homóloga de 56-kDa, que él llamó p56, interactuando con GR en las células humanas IM-9⁶⁹. Esta pequeña isoforma en las células IM-9 pronto fue descubierta al ser inducible por calor y por estrés químico, y fue nuevamente cambiado su nombre por Hsp56⁶⁹.

Más adelante, otros dos laboratorios continuaron con el descubrimiento de las proteínas de alto peso molecular unidas a FK506⁷⁰ identificando a Hsp56⁷¹ y p59⁷² como inmunofilinas unidas a FK506. En 1995 Baughman et al, demostraron la acumulación de la proteína unida a

FK506 (FKBP51) mRNA en células PBMC (células mononucleares de sangre periférica)⁷³.

Varios laboratorios han propuesto otras designaciones para esta inmunofilina que une a hsp90: FKBP52 o hFKBP52 ⁷⁴, FKBP51 (en un principio fue llamada así, ahora al ser denominada FKBP52 puede confundirse con otra inmunofilina pariente distinta que actualmente se denomina FKBP51, por lo que se tiene que aclarar para no confundirse)⁷⁵, FKBP59⁷², HBI (inmunofilina unida a la proteína de choque térmico)⁶⁴, y p59-HBI ⁷⁶. Aunque FKBP52 ahora es la nomenclatura estándar para esta proteína, se ha descubierto recientemente que la proteína del adenovirus unida a la secuencia D, ssD-BP, también es FKBP52⁷⁷, ilustrando la versatilidad de esta particular inmunofilina.

2.2.1.1 ESTRUCTURA

Lebeau et al. clonaron la secuencia de DNA de FKBP52 del hígado de conejo⁷⁸. Desde entonces, los análisis de secuencia, hidrofobicidad y estructura cristalina han demostrado que, independientemente de la especie animal, la inmunofilina se compone de cuatro distintos dominios (los dominios de la FKBP52 humana se esquematizan en la figura. 2.7):

- I. Los primeros dos dominios incluyen un sitio funcional para la actividad Peptidil Proil *cis/trans* Isomerasa (PPIasa)
- II. Y una región semejante a PPIasa, ambos similares en estructura al dominio PPIasa de FKBP12.

- III. Tres dominios de la Repetición del TetratricoPeptido (TPR) ocupan el tercer dominio estructural
- IV. Mientras que el cuarto dominio C-terminal contiene un sitio de unión obligatoria a calmodulina.

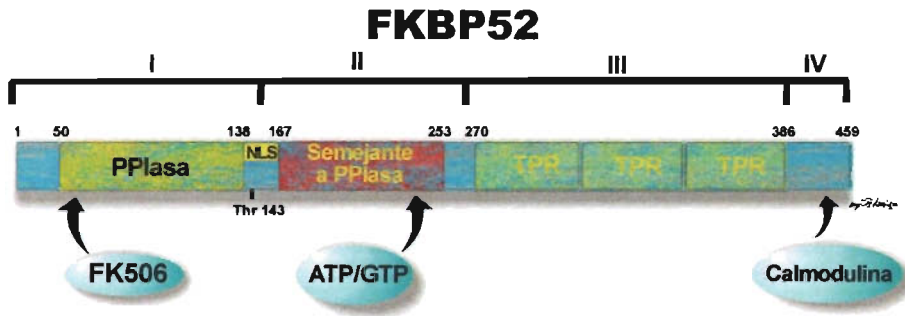


Figura 2.7 . Dominios funcionales de FKBP52 humano. PPIase, sitio de actividad Peptidil Prolil cis/trans Isomerasa (PPIase). TPR, dominios de la repetición del tetratrico-peptido responsables de la interacción con Hsp90.

Los primeros 138 aminoácidos N-terminal constituyen el dominio PPIase de FKBP52 y presentan actividad de PPIase en los substratos del péptido en un ensayo acoplado a proteasa únicamente cuando son expresados⁷⁶. De forma similar a FKBP12, el enlace de FK506 también se presenta en el primer dominio de FKBP y el más grande⁷⁹. A diferencia de FKBP12, FKBP52 no inhibe calcineurina cuando une a ligandos inmunosupresores^{78 75 79}. Un solo aminoácido, Lys121, que corresponde a Ile90 de FKBP12, es responsable de esta carencia de unión a calcineurina⁸⁰.

A pesar esta carencia de asociación a calcineurina, las interacciones con otras proteínas, incluyéndose a sí mismo como dímero, se sabe que dependen del primer dominio de FKBP52. Aunque se cree ampliamente

que solo una molécula de inmunofilina une a Hsp90 en un complejo maduro, FKBP52 se dimeriza ⁷⁵. El sitio para la dimerización probablemente está cercano o encajado dentro del dominio de PPIase, pues un fragmento proteolítico que contiene el primer dominio funciona como dímero independiente del resto de la proteína ⁷⁹. Hsp90 unida por las inmunofilinas se ha estudiado bien y, aunque un número creciente de proteínas Hsp90 blanco se han encontrado para asociarse a FKBP52, la relación entre esta inmunofilina y el GR se entiende cada vez más.

Dentro del heterocomplejo del receptor esteroide, el dominio I de FKBP52 es necesario para potenciar la transactivación del GR y, por lo tanto, se piensa que es el responsable de la interacción directa del receptor⁸¹. Sin embargo, la interacción directa entre un receptor esteroide y FKBP52 se ha demostrado solamente en una solución purificada con GST-hGR en el cual la adición de los fragmentos del dominio de PPIase o del dominio de TPR no pudo inhibir una unión débil inmunofilina-GR⁸². El dominio de PPIase, sin embargo, es claramente necesario para la asociación de Dineína al complejo de GR⁸³.

Mientras que el segundo dominio también comparte la homología con FKBP12 (el 28%), la actividad de PPIase⁷⁶ y este dominio no se ha demostrado que une a FK506. Un aspecto significativo del dominio II, con excepción de la relación cercana a un sitio de actividad de PPIase, es una secuencia consenso unida a ATP/GTP entre los aminoácidos 199 y 222 ⁶⁴

⁸⁴. Todavía debe ser determinado si el sitio unido al nucleótido funciona in vivo. Aunque pocas actividades se han encontrado en el dominio II, las secuencias funcionales entre los primeros dos dominios existen. Thr-143 en la región bisagra entre los dominios I y II es fosforilada por la caseína cinasa 2 (CK2) previniendo la unión de FKBP52 a Hsp90⁸⁵.

Un aminoácido ocho de la secuencia, también encontrada en esta región bisagra, es electrostáticamente complementario a las Secuencias Nucleares de Localización del receptor (NLS) y los anticuerpos para la translocación lenta de la secuencia del ligando GR al núcleo⁸⁶. Hay fuerte evidencia que la asociación de FKBP52 a todos los receptores esteroides requiere las tres regiones TPR situadas en el dominio III ^{87 88}. TPRs esta altamente modificado en 34 aminoácidos de las secuencias que median interacciones proteína-proteína⁸⁹.

FKBP52, junto con otras inmunofilinas asociadas a GR y PP5, unen a la secuencia C-terminal EEVD de Hsp90 por medio de interacciones electrostáticas⁹⁰. Las mutaciones puntuales a cualquiera de las diversas secuencias básicas dentro de los dominios de TPR pueden evitar la unión a Hsp90 ⁸⁸. A pesar de su actividad prolil isomerasa, la actividad co-chaperona de FKBP52 parece ser independiente del dominio PPIase de la proteína ⁹¹ y dependiente de los dominios de TPR via un mecanismo que requiera el enlace a Hsp90 ⁹². Más allá de los dominios TPR están dos sitios de unión obligatoria a calmodulina (CaM) ocupando el C-terminal de FKBP52 (dominio IV). FKBP52 también contiene las secuencias del PEST

encontradas generalmente en las proteínas unidas a CaM ⁹³. El inhibidor de calmodulina, fenoxibenzamina, disminuye fuertemente la unión de la hormona GR, aunque esto no aplica cuando esta con FKBP52 o Hsp90⁹⁴ ⁹⁵. La eliminación de esta región reduce la afinidad obligada de FKBP52 a Hsp90⁹⁶.

2.2.1.2 FUNCIÓN BIOLÓGICA

Se sabe que FKBP52 se puede encontrar asociado con receptores esteroides ⁹⁷ y otras proteínas ⁹⁸ en un complejo con Hsp90. FKBP52 pueden establecer unión con alguna proteína si Hsp90 está presente ⁹⁹ ¹⁰⁰. Se ha demostrado que FKBP52 afecta la transactividad regulada por GR. La fracción citoplásmica de FKBP52 se localiza en los microtubulos ⁹⁹ ¹⁰⁰ ¹⁰¹ y la dineína co-purificada con FKBP52 ⁹⁹ ¹⁰⁰.

La asociación de dineína a FKBP52 es dependiente del dominio de PPIase, mientras que la purificación co-inmune de GR con la proteína motor requiere de ambos dominios I y III de FKBP52. Esto sugiere que la inmunofilina es una porción que funciona como adaptador entre la dineína, que une en el sitio de PPIase, y el complejo GR/Hsp90, que unen en el dominio TPR ¹⁰².

El papel de FKBP52 en la traslocación de receptores al núcleo ha sido consolidado por el reciente descubrimiento de un mecanismo de conmutación en el cual hay un intercambio de las funciones de FKBP51 a

FKBP52 en los complejos de GR¹⁰³. Este intercambio también conduce al co-reclutamiento de la proteína motor dineína y el movimiento de GR como complejo al núcleo de las células intactas (fig. 2). Así, es probable ahora que la incorporación diferenciada de las proteínas TPR en complejos del receptor esteroide pueda formar la base para el tráfico subcelular de receptores. Según lo indicado, FKBP52 puede acompañar a GR al núcleo¹⁰³, pero se sabe más sobre que las interacciones Hsp90/inmunofilina ocurren en el citoplasma.

Todavía, la mayoría de FKBP52 está situada en el núcleo^{99 100 101}. Dos fenómenos recientemente descubiertos pueden verter una cierta luz en funciones desconocidas de FKBP52. Primero, Gold et al.,¹⁰⁴ descubrieron que el alargamiento axonal en neuronas se puede estimular por FK506 a través de un mecanismo que implique probablemente a FKBP52.

Qing et al.,⁷⁷ encontró que la proteína de cadena única, la proteína unida a la secuencia D (ssD-BP), una proteína que une a la secuencia D del genoma del adenovirus para prevenir la síntesis de la segunda cadena, es FKBP52. La fosforilación de la Tirosina de FKBP52/ssD-BP por el factor de crecimiento epidermal receptor de tirosin cinasa (EGF-RTK) requiere la unión a la secuencia D para inhibir la replicación del adenovirus. Sin embargo, una Proteína Tirosin Fosfatasa de la Célula T (TC-PTP) se identificó que invierte la tirosin fosforilación de FKBP52/ssD-BP y el efecto inhibitorio sobre la replicación del adenovirus¹⁰⁵. En una

última versión, FKBP52, una proteína sin dominio reconocible de unión a DNA, al parecer ahora actúa como proteína de unión a DNA de cadena única para proteger las células contra la réplica de genomas virales. Es probable, por lo tanto, que muchas otras funciones, especialmente en el núcleo, serán descubiertas sobre este inmunofilina multifuncional.

2.2 FKBP 51

Se sabe que los niveles crecientes de FKBP51 son la causa común de la resistencia a glucocorticoides en tres nuevos primates del mundo¹⁰⁶. Aunque sigue sin ser aclarada la exacta contribución mecánica de las inmunofilinas para la función del GR, el papel funcional si se ha proporcionado^{107 108}. La sobreexpresión de FKBP51 reduce la afinidad del GR por los GC y, por lo tanto, disminuye la actividad transcripcional de GR después de la exposición a la hormona¹⁰⁹.

En levadura, la sobreexpresión de FKBP51 no tiene ningún efecto por GR, pero FKBP52 induce la transcripción dependiente de GR. Esta activación es dependiente de la interacción con hsp90 y la actividad peptidil prolil isomerasa (PPIase) de FKBP52¹⁰⁸.

La unión a hsp90 de las inmunofilinas es esencial, al igual que la actividad PPIase de FKBP52 se requiere para modular la unión y, así, la actividad transcripcional de la hormona unida a GR. Por otra parte, se sabe que en células de mamífero el desplazamiento nuclear de GR también es regulado por las inmunofilinas. Detectamos la unión diferenciada de

FKBP52 y de FKBP51 a dineína, que corresponde a su efecto diferenciado sobre el desplazamiento nuclear. Así, en mamíferos, las diferencias entre FKBP51 y FKBP52 regulan a los GR en dos niveles: unión a la hormona¹⁰⁹ y desplazamiento nuclear.

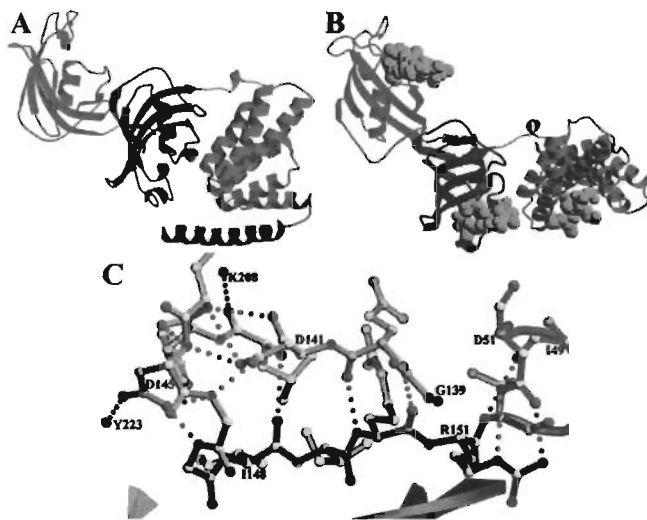


Figura 2.8 . Estructura cristalina de FKBP51. (A) Estructura: verde claro es el dominio I (FK1), verde oscuro es el dominio II (FK2), rojo es el dominio III (ó dominio TPR), y amarillo es el dominio IV (enlace entre dominios). (B) En este caso, la coordinación de un dominio similar (FKBP12, FKBP21, y el dominio TPR 2a) unido a un ligando [rapamicina (39), rapamicina y Hsp90 (37), respectivamente]. El ligando resultante coordinado se muestra con átomos finamente separados en amarillo. (C) hidrógenos extensamente unidos a la región de unión entre FK1 y FK2. En amarillo las uniones son las regiones de unión, los enlaces verde oscuro son FK2, y los enlaces verde claro son FK1.

En células de mamífero, el mecanismo para la acción inhibitoria de FKBP51 en GR implica la debilitación del desplazamiento nuclear además de la reducción en la afinidad de unión a GC¹⁰⁹. La unión discriminada de FKBP51 y de FKBP52 a la proteína motor, la dineína, el desplazamiento nuclear retrasado de GR, y las diferencias entre estas inmunofilinas afecta a los fragmentos del dominio PPIase en el desplazamiento nuclear. Solamente el dominio de PPIase de FKBP52 que une a dineína¹¹⁰ retrasa el desplazamiento nuclear y la actividad de GR. La interrupción de la

maquinaria de transporte por la sobre expresión de la dinamitina de la subunidad p50 también redujo actividad de GR. Aunque la sobre expresión de FKBP52 no tenía ningún efecto en actividad de GR en células mamíferas, realizó la transcripción GR en la levadura¹⁰⁸.

En contraste con las células mamíferas, donde se optimizó la señalización del esteroide, la levadura es desprovista de los receptores esteroides, las FKBP5 grandes, y otros reguladores potenciales de GR, dando por resultado una baja actividad de GR. Por lo tanto, los factores tales como FKBP52, que promueven la señalización del GR, producen un efecto en levadura pero no en un ambiente óptimo para el GR en mamífero. Por el contrario, los factores tales como TPR de FKBP51, que no apoyan al GR, producen un efecto en células mamíferas pero no en levadura.

Al parecer, en mamíferos, las pequeñas diferencias en el dominio de PPIase entre FKBP51 y FKBP52 conducen a la unión diferencial a dineína. El efecto principal de la interrupción de la unión del GR a la dineína parece ser un desplazamiento nuclear retrasado. Bajo condiciones fisiológicas, GR se utiliza después del estrés¹¹¹. Se sabe que el nivel de GC aumenta a los 30 minutos después del estrés agudo en ratas y vuelve a los niveles basales poco después, una hora¹¹². Por lo tanto, después del estrés agudo, cuando los niveles del GC están saturados, la función inhibitoria de FKBP51 en el desplazamiento nuclear debe llegar a ser más importante que el efecto inhibitorio sobre la afinidad del GC. El acelerado

desplazamiento nuclear pudo también haber llegado a ser importante en mamíferos en algunas células especializadas tales como neuronas, donde los recorridos pueden ser absolutamente largos.

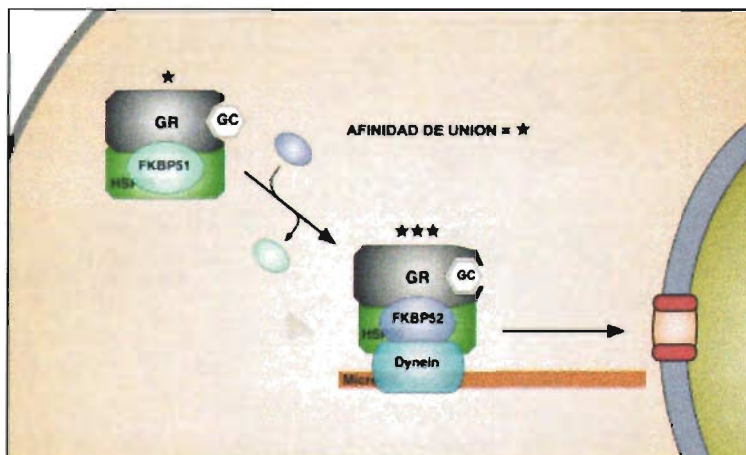


Fig. 2.9. Papel de FKBP52 en la función y transito del GR. Los complejos citoplásmicos GR contienen FKBP52 y FKBP51 con una relación muy cercana. GR acoplada con FKBP52 presenta una afinidad de unión a GC más elevada que los receptores acoplados con FKBP51. En algunos sistemas, FKBP51 parece ser la inmunofilina predominante en complejos de GR sin GC, y la causa del intercambio de FKBP51 por FKBP52 en la unión al GC. Siguiendo este intercambio, FKBP52 sirve para promover el desplazamiento del GR al núcleo debido a su interacción con la proteína motor, la Dineina. Aunque el papel reconocido de FKBP52 está en el control de las respuestas esteroides del receptor, existen otras funciones de desarrollo de FKBP52

El aumento en los niveles de FKBP51 representa un mecanismo celular para disminuir la potencia y la eficacia de GC con implicaciones fisiológicas múltiples y un buen modelo se observa cuando FKBP51 es inducido por Dexametasona^{113 114}. Esto representa un vínculo auto regulatorio directo para controlar la acción del GC. Theo Rein y colaboradores¹¹⁵ proponen que tres características de las grandes inmunofilinas son esenciales para la eficiencia en la señalización de GR en mamíferos:

- 1) La interacción con hsp90
- 2) La asociación con la dineina;
- 3) La actividad enzimática de PPIase.

Aunque FKBP52 satisface los tres requisitos, FKBP51 carece la interacción con el dineína. Además, la conformación de FKBP51 se ha propuesto que evita que el dominio de PPIase actúe en las prolinas relevantes de GR¹⁰⁸. La primera característica es la interacción con hsp90 vía el dominio de TPR, siendo necesaria para competir con otras proteínas de TPR y así poder acceder al heterocomplejo del GR. La segunda característica, es la unión a la dineína vía el dominio PPIase, ya que se requiere la asociación con la maquinaria de transporte.

Debido a que el dominio PPIase de FKBP51 no puede unir a dineína, FKBP51 interrumpe la asociación de GR a dineína y de esta forma inhibe el desplazamiento nuclear del GR. Por lo tanto, la actividad enzimática PPIase se puede requerir para el desplazamiento nuclear eficiente. Por otra parte, la actividad enzimática PPIase de FKBP51 no tiene contribución activa en la acción inhibitoria de esta proteína. La tercera característica es que la actividad enzimática de PPIase parece ser necesaria para la unión eficiente al GC.

Las alteraciones que afectan la unión de GC tienen un efecto más fuerte que las alteraciones que afectan el desplazamiento nuclear¹¹⁵. La actividad PPIase deficiente de FKBP52 participa de forma recíproca con la dineína, y por esto regula fuertemente la transactivación dependiente de GR. Se propone que la relación entre las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 es un interruptor en la señalización del GR y su desplazamiento a núcleo¹⁰³.

En cantidades elevadas de FKBP51 no se observa cambio alguno que sea perceptible, lo cual ha sido observado en primates, los cuales tienen hasta 26 veces más aumentado el cociente FKBP51/FKBP52 con respecto al ser humano¹⁰⁹ ó en cultivo celular inducido¹¹⁵.

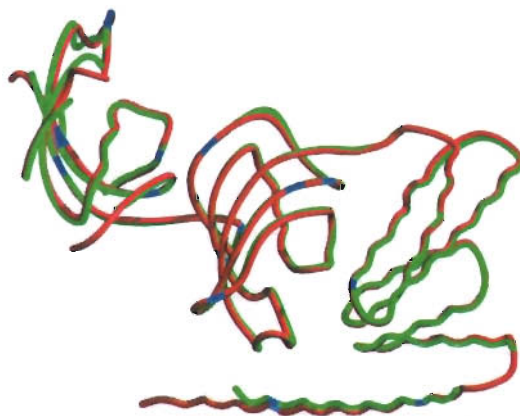


Figura 2.10. Comparación estructural de las proteínas FKBP51 del mono ardilla y de humano. La proteína del mono (rojo) es superpuesta a la humana (verde). Las dos proteínas tienen pequeñas diferencias en sus estructuras. En azul se muestran las zonas que son diferentes.

Aunque los datos en mamíferos y en levadura¹⁰⁸ indican que el dominio más importante para caracterizar la diferencia entre FKBP51 y FKBP52 con respecto a GR es el dominio N-terminal de PPIase, no podemos descartar que otros dominios también contribuyan a esta diferencia. Interesantemente, y a diferencia del dominio TPR, las demás regiones participan en la interacción con hsp90 de diferente forma para FKBP51 que para FKBP52¹¹⁶.

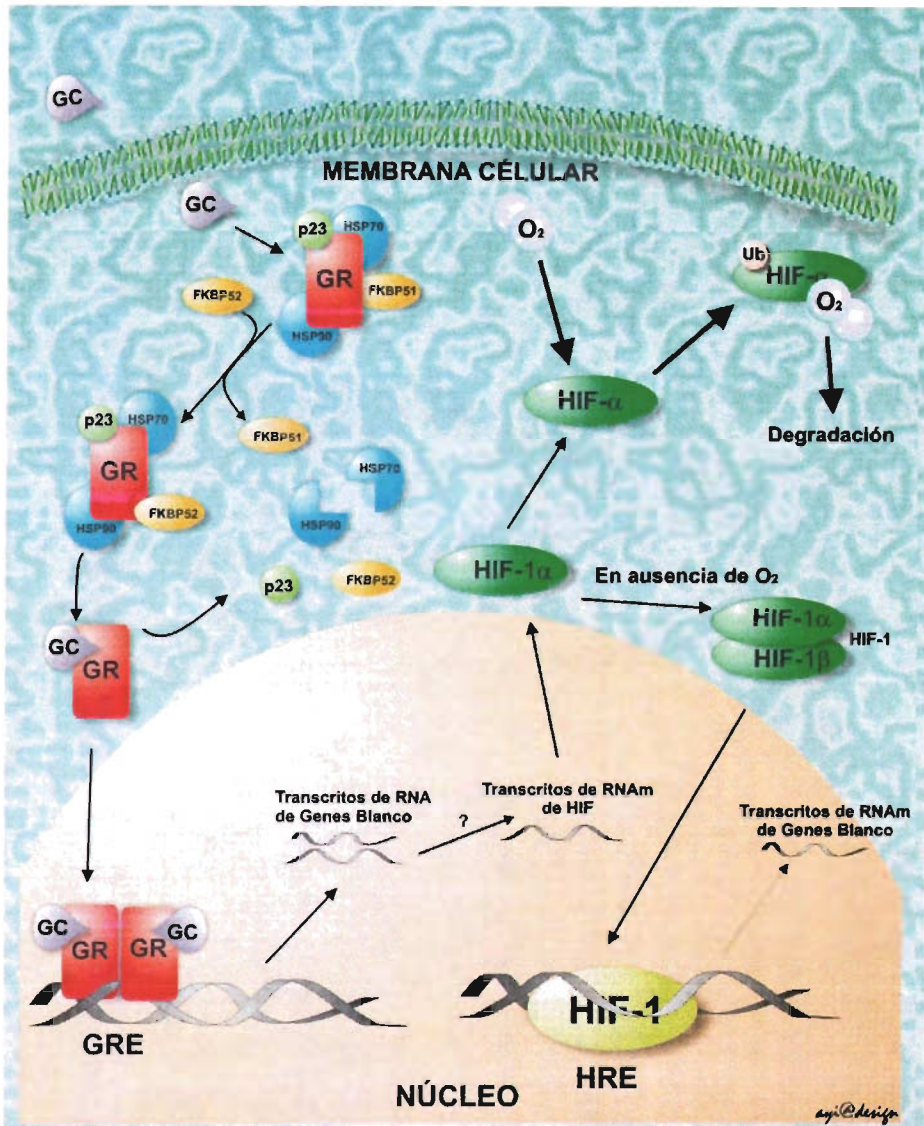


Figura 2.11. Representación gráfica en la cual se observa la regulación del Receptor de Glucocorticoides y de HIF-1 como coactivadores de la expresión genética de una variedad de moléculas. GC: Glucocorticoides. GR: Receptor de Glucocorticoides. HIF-1: Factor Inducido por Hipoxia. Ub: ubiquitinación de proteínas. GRE: Elemento de Respuesta a Glucocorticoides. HSP: Proteínas de Choque Térmico. p23: proteína de pequeño peso molecular asociada al complejo GR. FKBP: Inmunofilinas, o Proteínas Unidas al fármaco inmunosupresor FK506⁹. Esquema adaptado^{17 118 119}.

2.3 HIPOXIA

Las células de mamífero han desarrollado un rango de adaptaciones para sobrevivir a la carencia de oxígeno por debajo del 5%, esta carencia es conocida como hipoxia. La hipoxia reduce la habilidad de la célula para mantener sus niveles de energía, debido a que se obtiene menos ATP por glicólisis que por fosforilación oxidativa. Por lo que se presenta un daño vascular que lleva a malformaciones las cuales evitan el suministro de oxígeno y nutrientes por medio de la sangre.

Estas carencias de oxígeno y nutrientes priva de energía a la célula. Bajas cantidades de ATP en células tumorales con hipoxia disminuye la cascada apoptótica e induce muerte necrótica¹²⁰. La célula se adapta induciendo la expresión de genes vinculados o involucrados en glicólisis, como son factores que estimulan la angiogenesis y la proliferación celular permitiendo una mejor oxigenación del tejido¹²¹ por lo que la hipoxia se ha estudiado comúnmente en tumores sólidos ¹²²

La hipoxia severa lleva a muerte, por apoptosis o necrosis, seleccionando células y previniendo la acumulación de aquellas con mutaciones inducidas por hipoxia. La hipoxia severa con altas cantidades de ATP induce muerte por apoptosis, y no por necrosis, mientras que niveles por arriba del 5% de oxígeno previene la muerte ^{123 124}.

2.3.1 HIPOXIA Y APOPTOSIS

La Hipoxia prolongada lleva a muerte celular programada. Algunas células que se adaptan y se seleccionan por resistencia a hipoxia tienen un fenotipo agresivo¹²⁵ lo cual las lleva a una menor sensibilidad a apoptosis (células adaptadas). Esto fue observado en ensayos de respuesta antitumoral en el cual estas células responden menos al tratamiento antitumoral¹²⁶. El regulador clave de la respuesta a hipoxia es el complejo HIF-1, el cual puede inducir apoptosis^{127 128}, prevenir la muerte celular, o regular el estímulo de proliferación celular.

2.3.2 Factor Inducido por Hipoxia 1 (HIF-1)

HIF-1 es un heterodímero compuesto por HIF-1 α y HIF-1 β que es expresado constitutivamente¹²⁹, también llamado Receptor Nuclear Aril Hidrocarburo Traslocador, que heterodimeriza con algunos otros factores, como el Ahr (factor de transcripción)¹³⁰.

HIF-1 α es inducido por hipoxia y por algunos oncogenes¹³¹. Durante normoxia la proteína HIF-1 α se expresa pero es inestable. La rápida degradación de HIF-1 α por el proteasoma es resultado de su ubiquitinación por el producto del gen supresor del tumor Von Hippel Lindau (VHL). Lo anterior se observó en pacientes que habían perdido este gen (VHL), con lo que se comprobó que HIF-1 α y genes dependientes de HIF-1, como son factores de angiogénesis, también se expresaban bajo condiciones de normoxia¹³².

Tabla 2.3. Expresión de Genes Inducidos por Hipoxia¹³³.

Producto del Gen Blanco	Factor de Transcripción	Producto del Gen Blanco	Factor de Transcripción
Adenilato cinasa 3	HIF-1	Receptor α_{1B} -Adrenergico	HIF-1
Adrenomedulina	HIF-1	Aldolasa A	HIF-1
Aldolasa C	HIF-1	Anhidrasa Carbónica -9	HIF-1
Ceruloplasmina	HIF-1	Ciclooxigenasa-2	HMG I(Y), NF-kB
Endothelin-1	HIF-1	Enolasa-1	HIF-1
Erythropoietin	HIF-1	GADD153	Not determined
Transportador de Glucosa -1	HIF-1	Transportador de Glucosa -3	HIF-1
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	HIF-1	Hexocinasa-1	HIF-1
Heme oxygenasa-1	AP-1,HIF-1	Factor de Crecimiento Semejante a Insulina -2 (IGF-2)	HIF-1
Hexocinasa-2	HIF-1	Proteína unida a IGF-2	HIF-1
IGF-binding protein-1	HIF-1	Interleucina-6	NF-IL6
IGF-binding protein-3	HIF-1	Nitric oxide synthase-2	HIF-1
Lactato deshidrogenasa A	HIF-1	Ornitina descarboxilasa	No determinado
NIP3	HIF-1	p27	No determinado
p21	HIF-1	Fosfofructocinasa L	HIF-1
p35srj	HIF-1	Inhibidor-1 del Activador de Plasminogeno	HIF-1
Fosfoglicerato cinasa-1	HIF-1	Piruvato cinasa M	HIF-1
Prolyl-4-hydroxylase a(I)	HIF-1	Transferrina	HIF-1
Tissue factor	EGR-1	Transforming growth factor b3	HIF-1
Transferrina receptor	HIF-1	Tirosin hidroxilasa AP-1	
Triosafosfato isomerasa	HIF-1	Receptor FLT-1 del VEGF	HIF-1
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)	HIF-1		

La unión de HIF-1 α - pVHL requiere de una modificación de HIF-1 α por prolin hidrolasas en el Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODD) dentro de la proteína HIF-1 α ^{134 135 136}, lo cual indica que estas enzimas son dependientes de oxígeno y por lo tanto HIF-1 α no puede ser hidrolizada durante hipoxia. La HIF-1 α , no hidrolizada, se

acumula y se trasloca a núcleo donde se une a HIF-1 β para formar el factor de transcripción activo HIF-1.

La estabilización de HIF-1 α por el dominio dependiente de oxígeno no es únicamente causado por prolin hidrolasas, HIF-1 α se vuelve inestable al unirse a p53¹³⁷. El dominio de activación Jun unido a la proteína 1 (Jab-1) interfiere directamente con el complejo HIF-1 α -p53 y lleva a la estabilización de la proteína HIF-1 α durante hipoxia¹³⁸. La HIF-1 α también está regulada a nivel transaccional, debido a que se encontró que las Secuencias de Entrada al Ribosoma Interno (IRES) fueron detectadas en los promotores de varios genes regulados por hipoxia, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), y HIF-1^{139 140}

Durante hipoxia, la traslación del Cap clásico dependiente de mRNA de transcripción, es reducido y solo el mRNA que contiene dichas secuencias (IRES) será trasladado. Solo el complejo HIF-1 α -HIF-1 β es activo. Para que HIF-1 α sea activo se tiene que acomplejar con HIF-1 β . El complejo HIF-1 se puede unir a la secuencia de elemento de respuesta a hipoxia (HRE; 5'-RCGTG-3') en el promotor de los genes blanco de HIF-1 para iniciar la expresión génica¹⁴¹. Algunos genes regulados por HIF-1 α están relacionados con diversas rutas de adaptación como son el metabolismo, la angiogénesis y la sobrevivencia, para vencer el estrés hipoxico. Sin embargo, en presencia de diferentes factores medioambientales HIF-1 está relacionada con apoptosis¹³¹.

2.4. APOPTOSIS

La muerte celular programada es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo planear su correcta morfogénesis, favoreciendo la renovación y eliminación de células del organismo. Esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta^{142 143 144 145}.

2.4.1 NECROSIS-APOPTOSIS.

La acumulación de observaciones, provenientes en su mayoría de sistemas modelo de desarrollo embrionario, pusieron de manifiesto algunas peculiaridades morfológicas de las células que morían en condiciones fisiológicas¹⁴⁴. De esta forma se acuñó el término apoptosis, por contraposición a la necrosis bajo condiciones patológicas. Los términos necrosis y apoptosis se refieren a los aspectos morfológicos de las células que mueren.

Una célula necrótica se hincha, explota y libera su contenido citoplásmico, lo que produce una respuesta inflamatoria al atraer células del sistema inmune. Originalmente se pensaba que todas las formas de muerte celular, o al menos una gran mayoría, se presentaban por esta vía. En una célula apoptótica, la cromatina se va a fraccionar, reduciendo paulatinamente su volumen y perdiendo porciones de citoplasma rodeados de membrana. Los cuerpos picnóticos, como se llaman dichos fragmentos, son engullidos por células vecinas y pueden desaparecer, en tan sólo una hora o poco más, sin dejar rastro ni inducir una respuesta inflamatoria.

Por ahora se maneja que la mayoría de las células muere por esta vía, tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

El término muerte por apoptosis, desde el punto de vista del mecanismo, responde a estudios que demostraron la existencia de una maquinaria intracelular de muerte cuyos componentes, codificados genéticamente, se expresan en todas las células con núcleo del organismo¹⁴⁶.

2.4.2 MECANISMO

Muchos los mecanismos de muerte apoptótica se han conservado a lo largo de la escala evolutiva desde nemátodos hasta mamíferos^{147 148}. Si se superan los mecanismos de control intra y extracelulares, independientemente de la naturaleza del estímulo inductor de muerte, el proceso siempre resulta en la activación de una cascada de proteasas que desmantelan la célula de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular.

2.4.3 EFECTORES INTRACELULARES

El mecanismo central de la maquinaria de muerte apoptótica en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado "caspasas"¹⁴⁹, por ser Cistein-proteASAS que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido ASPártico. Las caspasas responden al estímulo apoptótico mediante activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de

diferentes sustratos celulares y provoca la muerte celular. La primera caspasa que se describió fue la caspasa-1 o ICE (del Inglés, Interleukin-1 β -Converting Enzyme), homóloga en mamíferos de la proteína CED-3 de *Caenorhabditis elegans*^{150 151}, producto del gen *ced-3*, necesario para la muerte celular programada en este nemátodo^{152 153}. Se conocen actualmente 13 caspasas en mamíferos¹⁵⁴. De ellas, 6 se relacionan preferentemente con procesos inflamatorios y no con procesos de muerte celular, aunque todas comparten semejanzas en cuanto a secuencia proteica, estructura y especificidad de sustrato¹⁵⁵.

Estas enzimas participan en una cascada que es activada en respuesta a señales propapóticas, en las que el estímulo inicial activa a un zimógeno favoreciendo su maduración a una enzima activa. El primer grupo de enzimas activa a un segundo grupo de zimógenos y así sucesivamente amplificando al estímulo, las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las caspasas activas, de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden¹⁵⁶, terminando por fragmentar a la célula.

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominados procaspasas, que, una vez activados por proteólisis limitada y asociación de subunidades¹⁵⁷, adquieren la actividad catalítica para actuar sobre sus sustratos tras un residuo de aspártico. Reconocen, sin embargo, diferentes motivos tetrapeptídicos, lo cual les confiere cierta especificidad. Todas son expresadas como zimógenos (30 a 50kDa) que contienen tres dominios: un dominio NH₂-terminal, una subunidad grande

(~20kDa) y una subunidad pequeña (~ 10kDa). La activación involucra un proceso proteolítico entre dominios, seguida por la asociación de las subunidades pequeña y grande para formar un heterodímero. Dentro de cada dominio catalítico, ambas subunidades están íntimamente asociadas, contribuyendo necesariamente ambos residuos para la unión al sustrato y catálisis.¹⁵⁴

Las caspasas que participan en apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos: caspasas iniciadoras (8 y 9, y quizás 2 y 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), las cuales llevan a cabo la proteólisis sobre sus respectivos sustratos celulares provocando la reorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis¹⁵⁴.

2.4.4 REGULADORES INTRACELULARES

Los principales reguladores intracelulares de muerte son la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2, proteína de mamíferos homóloga estructural y funcionalmente a la proteína CED-9, esencial para la prevención de la muerte celular en *C. elegans*¹⁵⁸.

La familia de Bcl-2 en mamíferos está constituida hasta el momento por 15 miembros^{159 160} y todos ellos presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1 a BH4). Algunos miembros de la familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Puesto que ambos tipos pueden formar

heterodímeros, sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre muerte y supervivencia¹⁶¹. La proteína Bax promueve la muerte al interferir con la formación de homodímeros Bcl-2 – Bcl-2 a favor de la formación de heterodímeros como Bcl-2–Bax que no pueden interferir con la muerte.

Muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, de forma que pueden registrar daños en dichos orgánulos ¹⁶². El siguiente nivel de regulación se produce en la interacción de CED-4 en *C. elegans* ¹⁶³ y su homólogo Apaf-1 en mamíferos con algunas de las caspasas iniciadoras. Bcl-X_L y Bcl-2 impiden la activación del complejo Apaf-1/procaspasa-9¹⁶⁴, además de impedir directa o indirectamente la liberación de Citocromo C de la mitocondria, lo que a su vez parece ser responsable de un cambio conformacional en Apaf-1 que le permite procesar a la procaspasa-9 ^{165 166 167}.

Otro papel de las caspasas es inactivar proteínas que protegen las células de la apoptosis. Un claro ejemplo es el corte de I^{CAD}/DFF45, un inhibidor de la nucleasa responsable de la fragmentación de ADN, CAD (caspase-activated deoxyribonuclease). En células no apoptóticas CAD está presente como un complejo inactivo con I^{CAD}. Durante la apoptosis, I^{CAD} es inactivado por caspasas, dando lugar a CAD libre que funciona como una nucleasa.

2.4.5 REGULADORES EXTRACELULARES

Existe, además, otra vía de inducción de muerte (Figura 2) que implica la señalización a través de los llamados receptores de muerte de la super familia TNF. Los mejor caracterizados son Fas y receptor de TNF (del Ingles, Tumor Necrosis Factor), a los que se unen el ligando de Fas y TNF respectivamente, y que participan en la apoptosis del sistema inmune¹⁶⁸.

III

OBJETIVOS E HIPOTESIS

La primera operación del espíritu consiste en distinguir lo que es cierto de lo que es falso. Sin embargo, en cuanto el pensamiento reflexiona sobre sí mismo lo primero que descubre es una contradicción. A este respecto es inútil esforzarse por ser convincente. Desde hace siglos nadie ha dado de este asunto una demostración más clara y elegante que Aristóteles: "La consecuencia, con frecuencia ridiculizada, de estas opiniones es que se destruyen a sí mismas. Pues al afirmar que todo es cierto afirmamos la verdad de la afirmación opuesta y, por consiguiente, la falsedad de nuestra propia *Tesis* (pues la afirmación opuesta no admite que ella pueda ser cierta). Y si se dice que todo es falso, esa afirmación resulta también falsa. Si se declara que sólo es falsa la afirmación opuesta a la nuestra, o bien que sólo la nuestra es falsa, se está, no obstante, obligado a admitir un número infinito de juicios verdaderos o falsos. Pues quien emite una afirmación cierta declara al mismo tiempo que es cierta, y así sucesivamente hasta el infinito".

El mito de Sísifo
Albert Camus

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1 OBJETIVOS

GENERALES

- Demostrar que las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 regulan la expresión de genes del Factor Inducido por Hipoxia (HIF) en cultivo primario de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) estimuladas con Glucocorticoides (Dexametasona y Cortisol).

PARTICULARES

- Determinar la relación entre las inmunofilinas FKBP51 FKBP52 y el HIF-1 α a nivel de expresión genética.
- Conocer la concentración y el tiempo al cual se manifiesta una mayor expresión de FKBP51 y FKBP52.
- Comprobar las diferencias semicuantitativas en la expresión de FKBP51, FKBP52 y HIF- α bajo diferentes concentraciones de Glucocorticoides en cultivo primario de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC).
- Determinar la cinética de expresión semicuantitativa de moléculas HIF- α en Células Mononucleares de sangre Periférica mediada por Glucocorticoides.
- Determinar la cinética de expresión semicuantitativa de las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 en Células Mononucleares de Sangre Periférica mediada por Glucocorticoides.

3.2 HIPÓTESIS

Los GC añadidos a un cultivo primario de Células Mononucleares de Sangre Periférica provocan una disminución en la expresión de HIF-1 α (Factor Inducido por Hipoxia) y un aumento en la muerte por apoptosis.

La expresión de HIF- α depende de la regulación que se presenta entre las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 en la activación del Receptor de Glucocorticoides.

A mayor concentración de Glucocorticoides en el medio de cultivo, mayor expresión de Inmunofilinas y menor concentración de HIF-1 α .

IV

MATERIAL Y METODOS

"Hay un error en sus planteamientos. Los obreros responsables de la producción de cualquier artículo no tienen derecho sobre ellos. Ni los panaderos tienen derecho a más pan, ni los obreros del cemento a más sacos de cemento; ustedes tampoco a motocicletas"

Carta a los obreros de la planta ensambladora de motocicletas

Ernesto "Che" Guevara.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se plantea como un ensayo preliminar que nos permita observar los efectos de los glucocorticoides en células mononucleares de sangre periférica y así determinar diferencias encontradas bajo estímulos a diferentes concentraciones de cortisol y dexametasona. El estudio se hizo mediante un análisis de los resultados obtenidos por cada individuo para evitar introducir una variable más que sería manifestación del análisis interindividual.

Previo al estudio final se estandarizó el método y una vez conseguido esto se llevaron a cabo las determinaciones finales con muestras de sangre fresca, obtenidas de individuos sanos, utilizando un ensayo completo por individuo. Nuestras variables a estudiar son los efectos observados en una misma muestra pero con diferentes concentraciones de glucocorticoides. Las tendencias son el indicador, por lo que, de tres ensayos finales que se hicieron, se muestra el que presenta las tendencias más claras. Esta elección se hace en función a la literatura y a los ensayos previos hechos para estandarizar el modelo^{169 170}.

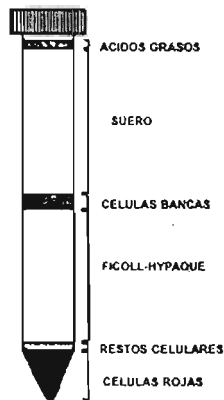
Las concentraciones utilizadas de glucocorticoides son rangos que presentan un efecto en cultivo celular¹⁷¹.

4.1 CULTIVO CELULAR

Se tomó una muestra de 75mL de sangre periférica total de donadores sanos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, utilizando Citrato de Sodio como anticoagulante. Un ensayo completo se realiza con la sangre obtenida de un solo donador siendo tres ensayos los que se llevaron a cabo.

Alicuotas de 15mL de la sangre fresca sin refrigerar, se transfirieren a tubos *Falcon* de 50mL, se adiciona 15mL de una solución amortiguadora de fosfatos PBS-K para obtener una dilución 1:1 y se homogeniza la suspensión suavemente.

Aparte en tubos *Falcon* de 50mL estériles se adiciona 15mL de Ficoll-Paque (*Sigma-Aldrich*®). Cuidadosamente se agregan 30mL de la suspensión anterior de sangre en una proporción 1:2 y se centrifuga (*Beckman CPKR Centrifuge*) a 1600rpm durante 25 minutos a temperatura de 10° C para separar las fases como sigue:



Una vez separadas las fases con ayuda de una pipeta *pasteur* estéril, se colectan las células mononucleares, identificadas por ser la fase de color blanco, en tubos *Falcon* de 15mL. Se centrifuga la fase de células blancas a 1600rpm durante 15 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende el botón suavemente.

Se añade 1mL de solución hemolizante para lisar a los posibles glóbulos rojos que se hallan podido ir cuando separamos las células blancas con la pipeta *pasteur*, se agita suavemente y se deja reposar por aproximadamente 1 minuto, inmediatamente después se añaden 5mL de PBS-K y se centrifuga a 1600rpm durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende el botón suavemente.

Las células resuspendidas se lavan con 15mL de PBS-K y se centrifuga a 1600 por 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 5mL de RPMI 1640 (*Sigma –Aldrich*®) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibiótico penicilina-estreptomicina (*Cellgro*®) al 1%.

Procedemos a contar las células para lo cual se toman 30μL de la suspensión anterior y se añaden 30μL de azul tripano (*Sigma Cell Culture*®), la mezcla se homogeniza bien en un tubo *ependorf*. Posteriormente se llenan ambas caras de contaje de un hematocitometro o cámara de *Neubauer* marca *PROPPER LUMICYTE. Bright-lined Rulling*®.

El conteo de las células a través de un microscopio marca *ZEISS*®, con objetivo 40X (ϕ 40/0,65), se llevó a cabo de la siguiente forma:

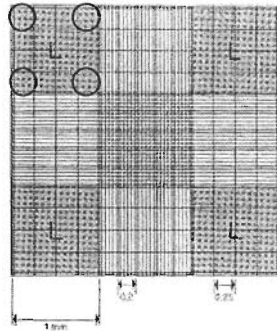


Figura 4.2. Esquema de las cuadrículas de la cámara de Neubauer, tal como se observan al microscopio.

Se cuentan las células de los cuadros sombreados (L), las cuatro cuadrículas de las esquinas en los cuatro cuadrados, que aparecen rodeados por un círculo en la figura anterior. Las células muertas se tiñen de azul, de tal forma que la diferencia entre las células vivas y las células muertas es muy clara.

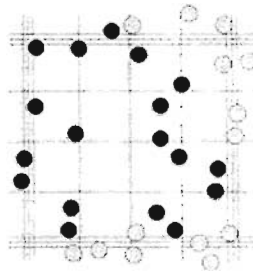


Figura 4.3. Esquema de una de las 4 cuadrículas seleccionadas, en la cual aparecen como puntos negros las células que deben ser contadas.

Se cuentan las células que tocan la línea superior y la línea izquierda del perímetro de cada cuadro, como aparece en la figura anterior. No se cuentan las células que tocan la línea inferior y la línea derecha del perímetro de cada cuadro.

El número de células en la suspensión se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{No. promedio de células por cuadrante} \times 10^4 \times 2 \times 5 = \text{Células/mL}$$

Donde:

- 10^4 es el factor de conversión de la cámara de Neubauer
- 2 es el factor de dilución de la suspensión con azul tripano
- 5 es el factor de dilución del botón celular en 5mL de medio RPMI

Una vez contadas las células viables que serán utilizadas, la suspensión es ajustada a 2, 000,000 células por cada 2mL RPMI 1640 suplementado. Las células se siembran en placas (*Costar®*), estériles para cultivo de 24 pozos con fondo plano, y se deja reposar en una incubadora marca *NAPCO® E SERIES. MODELO 5100, CO₂ INCUBATOR*, a 37°C y 5% de CO₂ durante 12 horas, para que las células se adapten al medio.

Transcurrido este tiempo las células de cada pozo se retiran a tubos cónicos *Falcon*, y se centrifugan a 1600rpm durante 15 minutos a 10° C. Se resuspende el botón suavemente y se lavan las células con 5mL de PBS-K, se centrifugan las células nuevamente a 1600rpm durante 10 minutos a 10° C, se decanta el sobrenadante y se adicionan 5mL de RPMI.

Las células se cuentan y se ajustan a 2×10^6 células por cada 1980µL de medio, siguiendo los pasos mencionados anteriormente. Nuevamente las células son sembradas en placas (*Costar®*), estériles para cultivo de 24 pozos con fondo plano, bajo condiciones de esterilidad, depositando

1980µL (2, 000, 000 células) a cada pozo y por cuadruplicado, de tal forma que tengamos cuatro placas de 24 pozos cada una.

- 1) Cortisol
- 2) Cortisol + RU486
- 3) Dexametasona
- 4) Dexametasona + RU486

Se añade finalmente 20µL de glucocorticoide (cortisol o dexametasona) y antagonista RU486 (mifeprestona) a tres concentraciones y tiempos diferentes (3, 6, 9, 12, 24, 48 horas), donde las concentraciones del antagonista son 10 veces más grandes que las de los glucocorticoides, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4.1.

Determinaciones experimentales								
Tiempo (hrs.)	Control (medio + células)	GC* (medio + células + GC*)			Control (medio + células) + RU486	Control Antagonista (medio + células + RU486 + GC*)		
3	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹
6	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹
9	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹
12	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹
24	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹
48	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁶ cel /pozo	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹

Cortisol o Dexametasona en concentraciones Molares.

Se incuban a 37° C y 5% de CO₂.

Una vez transcurridos los tiempos para las distintas concentraciones de glucocorticoides y su antagonista, se hace un ensayo de viabilidad por cuenta en cámara de Neubauer. Enseguida se recuperan las células en tubos *Falcon* de 15mL (un tubo por pozo) y añadimos 5mL de PBS-K, centrifugamos a 1600rpm durante 10 minutos a 10° C.

Decantamos el sobrenadante y se lavan las células con 1mL de PBS-K, tratando de desprender cuidadosamente las células que pudieran quedarse pegadas en cada uno de los pozos. Se evalúa la viabilidad de las células, considerando que el control a las 24 horas se mantenga en un porcentaje entre 90 -100% de viabilidad. Se centrifuga de nueva cuenta a 1600 rpm durante 10 minutos a 10° C. Se decanta el sobrenadante.

4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

El botón obtenido anteriormente es resuspendido suavemente en 250µL de Trizol (*Gibco BRL®*) con la finalidad de romper todas las membranas celulares y sea liberado todo el material genético al medio. Se almacenan las muestras a -70°C hasta su posterior uso para el RT-PCR. Las 96 muestras así obtenidas son descongeladas y se mantienen en hielo para comenzar la separación de RNA.

Se adiciona a cada tubo 50µL de cloroformo, teniendo en cuenta que es una parte de cloroformo por cada 5 partes de trizol, es decir [50µL de cloroformo/250µL de trizol]. Mezclamos en vortex e incubamos a temperatura ambiente cada tubo durante 10 minutos para separar las

fases. Una vez transcurrida la incubación se centrifuga a 12,000rpm durante 10 minutos a 4° C, para la separación del RNA.

Con ayuda de una micropipeta se extrae cuidadosamente la fase correspondiente al RNA, recuperándolo en tubos eppendorf, enseguida se adicionan 200μL de isopropanol mezclando suavemente cada tubo por inversión repetida para precipitar el RNA, incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugamos a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4° C.

Se decanta el sobrenadante y se adicionan 500μL de una mezcla de EtOH-H₂O al 75%, se vuelve a centrifugar a 12,000rpm durante 10 minutos a 4° C. Se decanta el sobrenadante y se seca perfectamente cada tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A cada uno de los 96 tubos adicionamos 30μL de H₂O destilada libre de RNAasas mezclándose en vortex.

Por un lado se toma 1μL de cada tubo de la mezcla anterior a los cuales adicionamos 49μL de H₂O para obtener una dilución 1:50. Una vez diluidos los 96 tubos se procede a leer la densidad óptica en un Biophotometro marca *Eppendorf*®, que nos indicará la concentración de RNA (μg/μL) a 260/280nm. Este paso nos permitirá saber que tan puro tenemos el RNA extraído, verificando así que no haya excesos de proteínas con un factor de corrección >1.40

4.3 ENSAYO DE INTEGRIDAD DEL RNA

1. Se prepara un gel de azarosa de las siguientes características

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

Es importante que se trabaje con el Paraformaldehido 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, y 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 las muestras recién preparadas
7. Finalmente el gel se corre en la cámara de electroforesis a 65V

4.4 OBTENCIÓN DEL cDNA COMPLEMENTARIO

A partir de las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenidas en el paso anterior, calculamos los μL que hay en $1\mu\text{g}$ de RNA, para obtener un volumen final de $20\mu\text{L}$ por cada tubo. Antes de adicionar los reactivos se incubaba a 70°C durante 10 minutos y posteriormente se incubaba a 4°C para adicionar la mezcla de reactivos como se indica a continuación (tabla 4.2):

Reactivos	Concentracion
Buffer 10X	1X
dNTPs 10mM	1mM
Oligo dT 50 μM	2.5 μM
(enzima) MuLV 10 mM	5 U/ μl
RNA total	$1\mu\text{g}$
Agua	cbp 20 μL
Vol. Final de reacción	20 μL

Tabla 4.2. Composición de reactivos para la obtención de cDNA.

Los 96 tubos son colocados en el termociclador (*Mastercycler Gradient Eppendorf*), bajo las siguientes condiciones:

Lid = 94°C		
	Nowait	Auto (tiempo)
1	T = 37.0°C	1:00:00
2	T = 70.0°C	0:10:00
6	Hold 4.0°C Enter (terminar a 4°C)	

Tabla 4.3. Condiciones del termociclador.

Una vez obtenidos los cDNA's procedemos a realizar el RT-PCR (Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa), para obtener un volumen final de 25µL adicionamos los siguientes reactivos:

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer 10X	2.5
dNTPs 10mM	1
Oligos*	2
(enzima) MuLV 10 mM	0.5
cDNA	5
Agua	14
Vol. Final de reacción	25 µL

Tabla 4.4. *Los oligos corresponden a las moléculas que queremos identificar si se expresan. En este caso son: GADPH, FKBP51, FKBP52 y HIF-1 α .

La amplificación de las secuencias se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones en el termociclador:

Lid = 95°C		
	Nowait	Auto (tiempo)
1	T = 95.0 °C	0:05:00
2	T = 95.0 °C	0:00:50
3	T = 56.0 °C	0:00:45
4	T = 72.0 °C	0:00:45
5	Go to 2 Repeat 27 (repetir 27 veces desde el paso 2)	
6	T = 72.0 °C	0:07:00
7	Hold 4.0 °C Enter (terminar a 4 °C)	
End		

Tabla 4.5. Condiciones del termociclador para la amplificación.

4.5 GEL DE AGAROSA

Preparamos un gel de agarosa al 1.2% disuelto en un buffer de tris boratos EDTA (TBE 0.5X), lo vaciamos en la caja de electroforesis y lo dejamos gelificar por aproximadamente 15 minutos con un peine de veinte pozos y se recubre con TBE 0.5X.

Se toma una alícuota de 5 μ L de las muestras obtenidas de cDNA en el RT-PCR por una gota de colorante mezclándose perfectamente y se inocula una muestra por cada pozo del gel de agarosa previamente preparado. Se pone un control negativo y el marcador de peso molecular por cada gel.

Se corre el gel haciendo pasar 80 volts de corriente del electrodo negativo al positivo, considerando que corre de cuatro a cinco centímetros por hora. En cuanto termine el corrimiento se observa con luz U.V. y se toma una fotografía ya que la muestra se difunde en el gel y se puede alterara el resultado.



RESULTADOS

Lo principal está ya hecho. Tengo algunas evidencias de las que no puedo apartarme. Lo que sé, lo que es seguro, lo que no puedo negar, lo que puedo rechazar, eso es lo que cuenta. Puedo negar todo de esta parte de mí mismo que vive de nostalgia incierta, salvo ese deseo de unidad, esa apetencia de solución, esa exigencia de claridad y cohesión. Puedo refutar todo en este mundo que me rodea, me hiere o me transporta, salvo ese caos, ese azar rey y esa divina equivalencia que nace de la anarquía.

El mito de Sísifo

Albert Camus

VI. RESULTADOS

5.1 DETERMINACION DE mRNA EN GEL DE AGAROSA

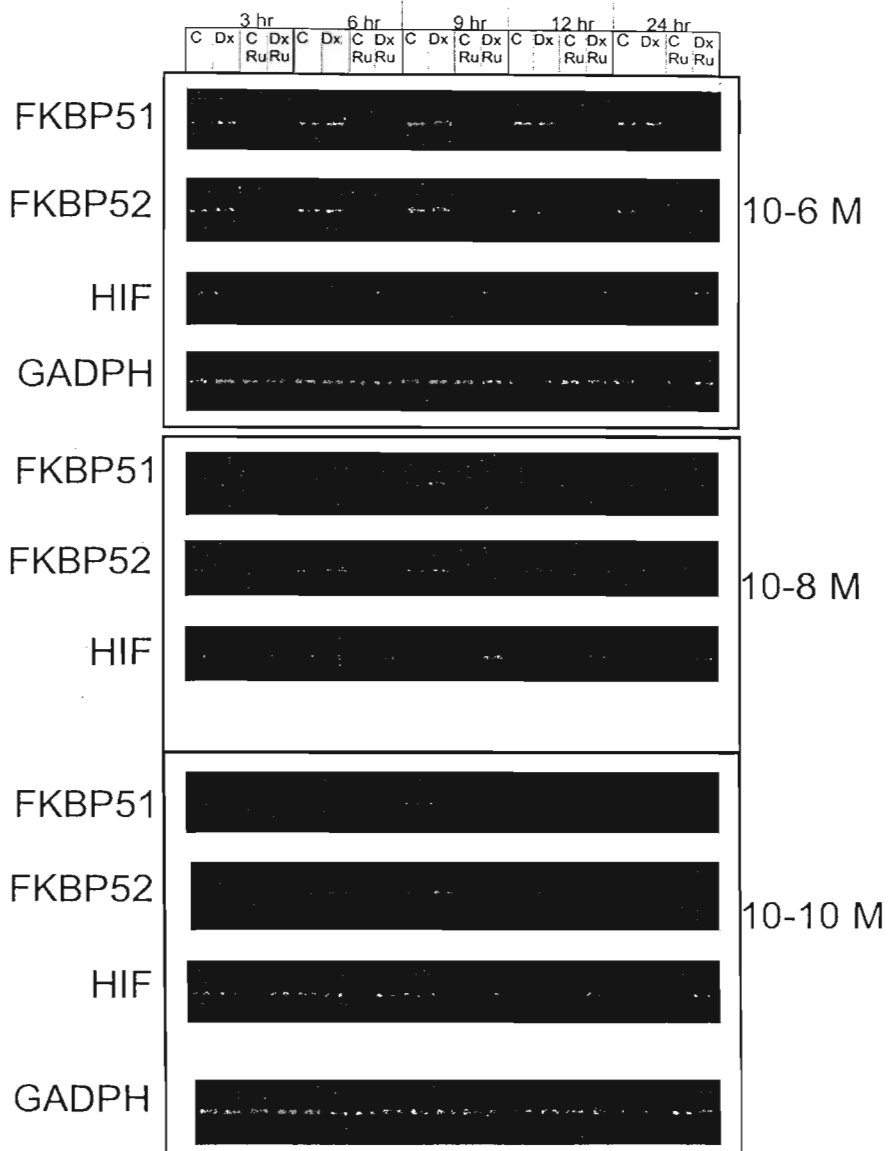


Figura 5.1. Expresión del mRNA de las moléculas en estudio, a tres diferentes concentraciones y cinco periodos de tiempo. GADPH se utiliza como marcador de expresión del RNA mensajero debido a que es constitutivo y no se ve afectado por el estímulo de GC

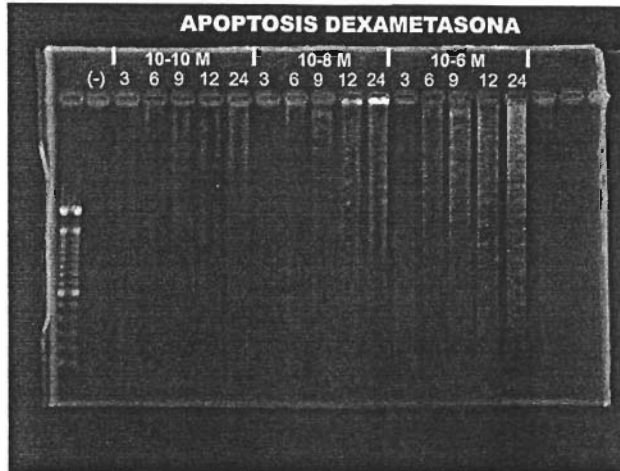


Figura 5.2 . Apoptosis a diferentes concentraciones de Dexametasona.

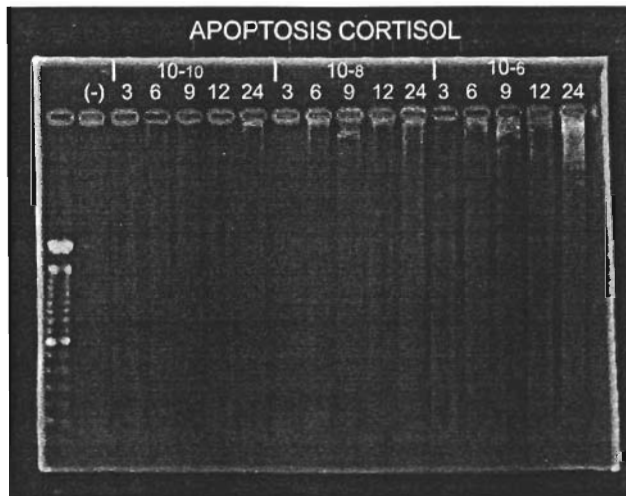


Figura 5.3 . Apoptosis a diferentes concentraciones de cortisol

En función a las inmunofilinas se puede observar que la expresión de estas moléculas se presenta con las mismas tendencias tanto con el estímulo de cortisol como con dexametasona, solo que los valores de las concentraciones de la expresión de las proteínas son menores con cortisol. El rango de concentraciones en el cual se mantienen dichas tendencias se encuentra disminuido en casi un cincuenta por ciento comparado a los valores detectados con dexametasona. En cuanto al HIF-1 α su expresión se manifiesta dentro de los mismos rangos de concentración del estímulo dado tanto por el cortisol como por dexametasona.

5.2 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA (DENSIDAD OPTICA) DE LA EXPRESIÓN DE RNA MENSAJERO.

Expresión del mRNA de las Inmunofilinas FKBP51, FKBP52 y del HIF-1 α con una concentración 10⁻⁶ M de Dexametasona (Grafica 1) y Cortisol (Grafica 4).

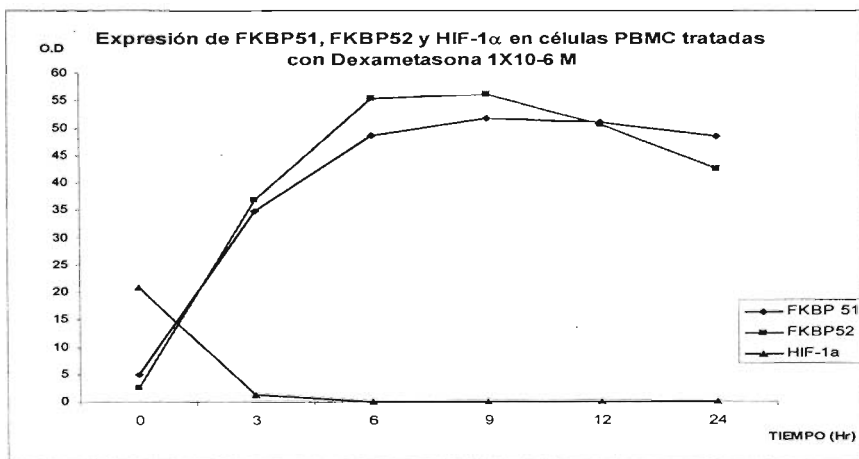
Se puede observar que al momento de agregar el estímulo, la respuesta entre las inmunofilinas y el HIF-1 α es opuesta. Mientras FKBP51 y FKBP52 elevan su expresión, el Factor Inducido por Hipoxia disminuye rápidamente. Los niveles mas elevados en la concentración de inmunofilinas se observan entre las 6 horas y las 9 horas después del estímulo con Glucocorticoides. Después de estos tiempos comienza a decaer la cantidad de inmunofilina que se expresa.

La concentración de FKBP52 crece mas rápidamente alcanzando un máximo mas elevado que su homologo FKBP51, pero la misma

inmunofilina comienza a bajar mas rápidamente. Sin embargo FKBP51 se mantiene más tiempo cercano al máximo decayendo su concentración más lentamente. En el caso de HIF-1 α la concentración inicial, al tiempo cero, comienza a disminuir considerablemente al momento de que se le agrega el estímulo de Dexametasona, por lo que a las 3 horas prácticamente ya no se detecta expresión. En la muestra con Cortisol se observa que la perdida en la expresión se manifiesta a un mayor tiempo, por lo que a las 6 horas todavía se alcanza a manifestar ligeramente una cantidad mínima del HIF-1 α .

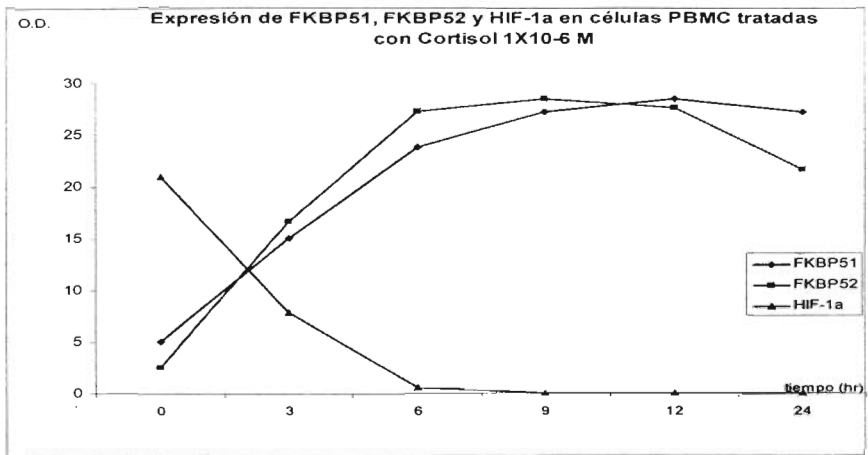
GRAFICA 5.1

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1 α
0	5	2.5	21
3	34.9	36.8	1.2
6	48.7	55.4	0
9	51.7	56.1	0
12	51	50.6	0
24	48.5	42.5	0



GRAFICA 5.4

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21
3	15	16.6	7.8
6	23.8	27.3	0.6
9	27.2	28.5	0
12	28.5	27.6	0
24	27.2	21.6	0

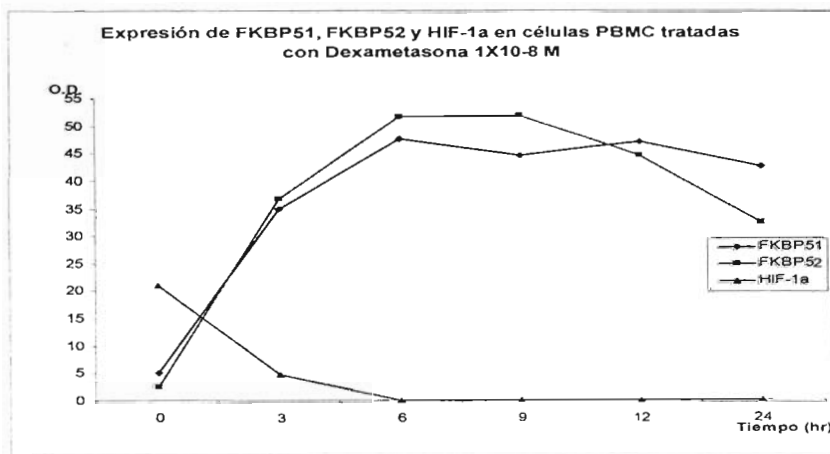


Expresión del mRNA de las Inmunofilinas FKBP51, FKBP52 y del HIF-1 α con una concentración 10⁻⁸ M de Dexametasona (Grafica 2) y Cortisol (Grafica 5).

El comportamiento en la expresión es muy parecido a la concentración anterior de 10⁻⁶ M, solo que en este caso el Factor Inducido por Hipoxia decae mas lentamente siendo hasta las 6 horas que se observa una expresión indetectable Dexametasona y con Cortisol hasta las 9 horas.

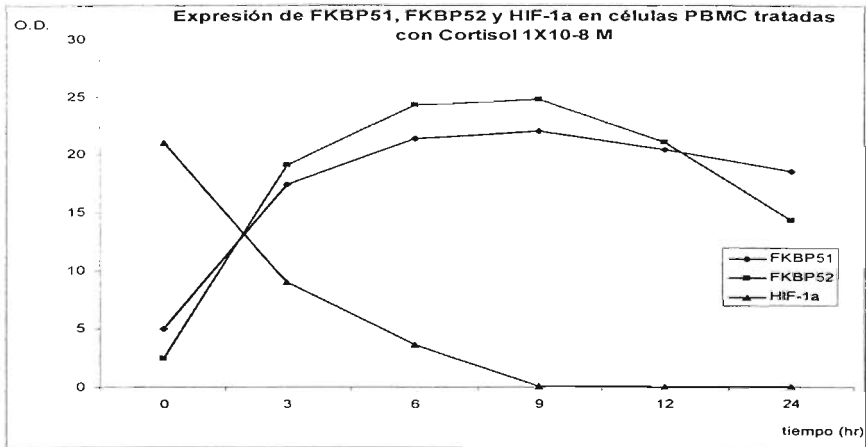
GRAFICA 5.2

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1 α
0	5	2.5	21
3	34.9	36.8	4.7
6	47.5	51.6	0
9	44.5	51.8	0
12	47	44.5	0
24	42.5	32.4	0



GRAFICA 5.5

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21
3	17.48	19.13	9.06
6	21.46	24.37	3.66
9	22.1	24.85	0.09
12	20.49	21.1	0
24	18.54	14.4	0



Expresión del mRNA de las Inmunofilinas FKBP51, FKBP52 y del HIF-1 α con una concentración 10^{-10} M de Dexametasona (Grafica 3) y Cortisol (Grafica 6).

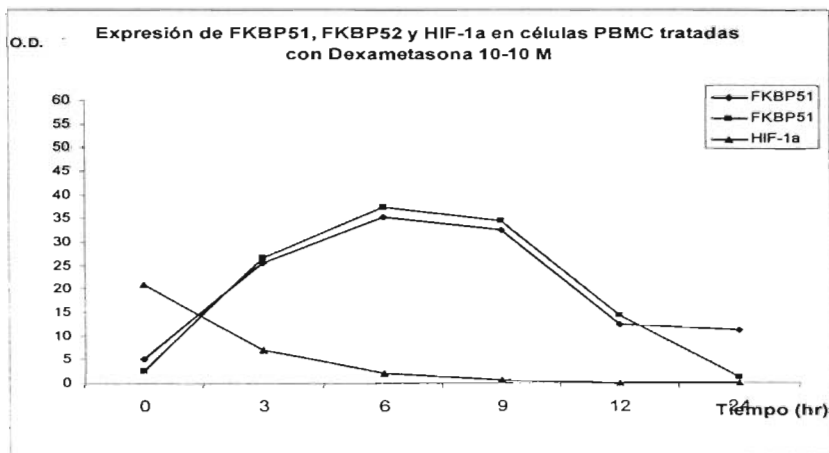
Los niveles de la expresión de inmunofilinas han disminuido, y de manera contraria, los niveles de HIF-1 α permanecen mas tiempo, alcanzando a detectar su presencia incluso a las 9 horas después del estímulo con dexametasona, En cuanto a la expresión inducida por cortisol, los niveles de HIF-1 α se recuperan en forma mas evidente que con

dexametasona, y aunque no se alcanza a establecer la concentración inicial, hay una menor pérdida en la expresión.

En cuanto a las inmunofilinas, se observa que la FKBP51 mantiene su tendencia, esto es, que al alcanzar un máximo en su concentración, decae mas lentamente que la FKBP52, presentándose estos valores en un rango de tiempo de entre 6 y 9 horas. La concentración de glucocorticoides es menor que en los casos anteriores. Así mismo la expresión de las inmunofilinas es menor.

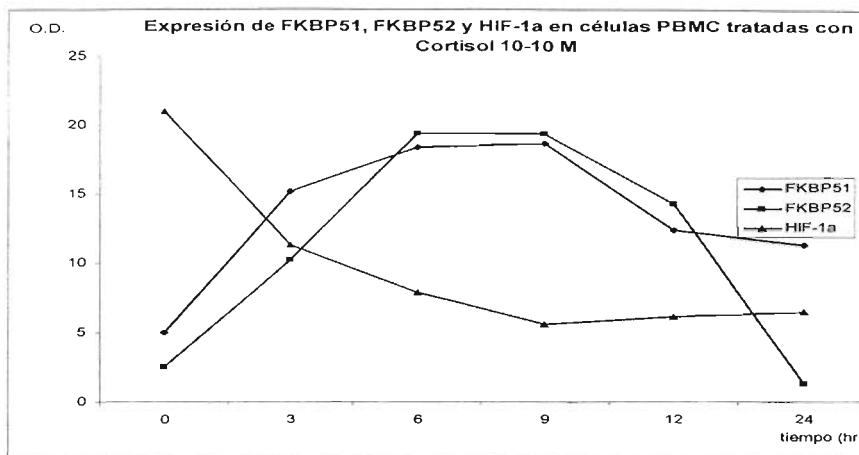
GRAFICA 5.3

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21
3	25.5	26.7	6.9
6	35.3	37.3	2.1
9	32.5	34.5	0.6
12	12.4	14.3	0
24	11.3	1.3	0



GRAFICA 5.6

Tiempo (h)	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21
3	15.2	10.23	11.3
6	18.38	19.4	7.9
9	18.68	19.37	5.6
12	12.4	14.3	6.1
24	11.3	1.3	6.5



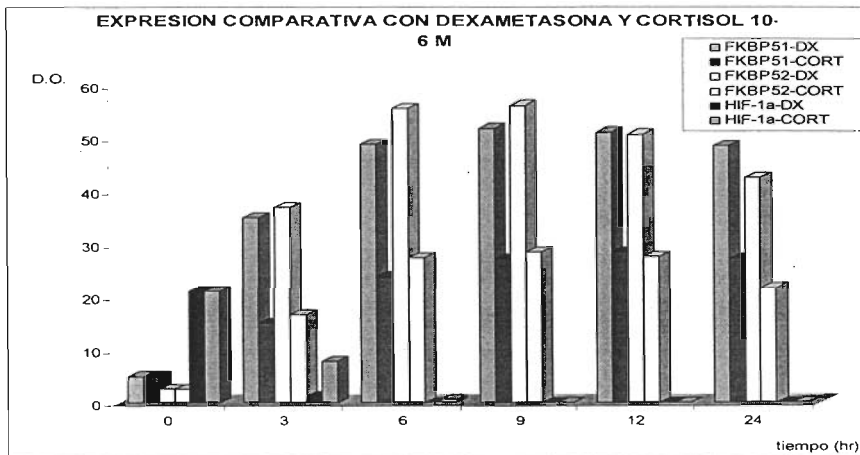
Expresión comparativa de inmunofilinas y HIF-1 α inducido por dexametasona y cortisol.

La expresión inducida por dexametasona presenta niveles semicuantitativos de proteína más elevados que los inducidos por cortisol. La expresión de HIF-1 α se manifiesta más con cortisol que con dexametasona. El estímulo por GC manifiesta un mayor efecto supresor por dexametasona que por cortisol. Esto lo comprobamos en las comparaciones hechas tanto en las graficas 7, 8 y 9 como en las que son exclusivas de la comparación de la expresión de HIF-1 α .

Asi mismo se puede comprobar que las mayores concentraciones en la expresión se encuentran entre las seis y las nueve horas después de aplicado el estímulo. Lo anterior se observa en las graficas 7, 8, y 9. Conforme disminuye la concentración de GC los rangos de expresión semicuantitativa de las proteínas en estudio disminuyen.

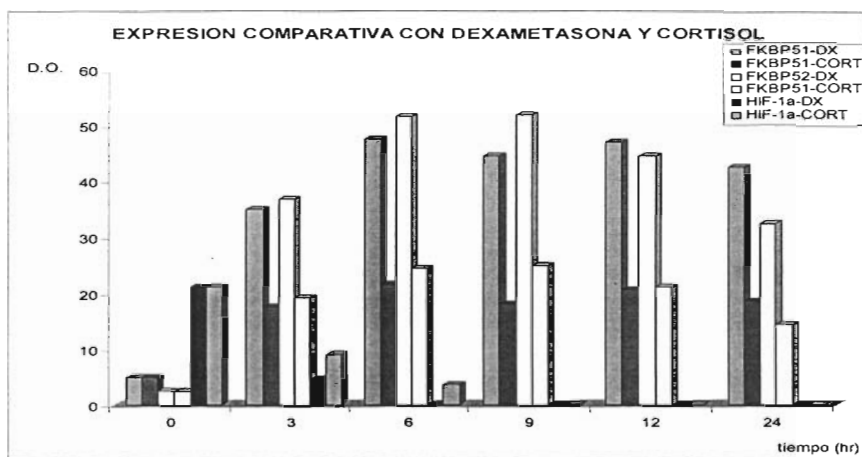
GRAFICA 5.7

Tiempo (h)	CON DEXAMETASONA			CON CORTISOL		
	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21	5	2.5	21
3	34.9	36.8	1.2	15	16.6	7.8
6	48.7	55.4	0	23.8	27.3	0.6
9	51.7	56.1	0	27.2	28.5	0
12	51	50.6	0	28.5	27.6	0
24	48.5	42.5	0	27.2	21.6	0



GRAFICA 5.8

Tiempo (h)	CON DEXAMETASONA			CON CORTISOL		
	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21	5	2.5	21
3	34.9	36.8	4.7	17.48	19.13	9.06
6	47.5	51.6	0	21.46	24.37	3.66
9	44.5	51.8	0	18	24.85	0.09
12	47	44.5	0	20.49	21.1	0
24	42.5	32.4	0	18.54	14.4	0



GRAFICA 5.9

Tiempo (h)	CON DEXAMETASONA			CON CORTISOL		
	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a	D.O. para FKBP 51	D.O. para FKBP 52	D.O. para HIF-1a
0	5	2.5	21	5	2.5	21
3	19.2	12.8	6.9	16.19	10.23	11.3
6	23.2	21.4	2.1	18.38	16.09	7.9
9	21.6	22.3	0.6	18.68	19.37	5.6
12	12.4	14.3	0	12.4	14.3	6.1
24	11.3	1.3	0	11.3	1.3	6.5

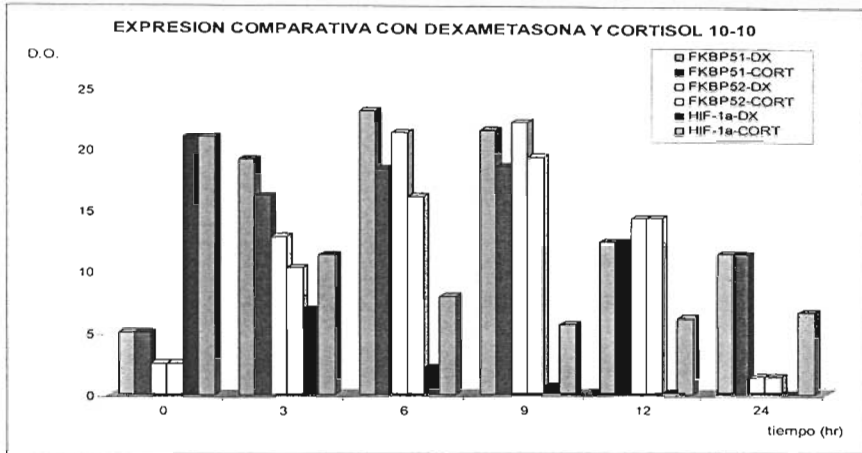
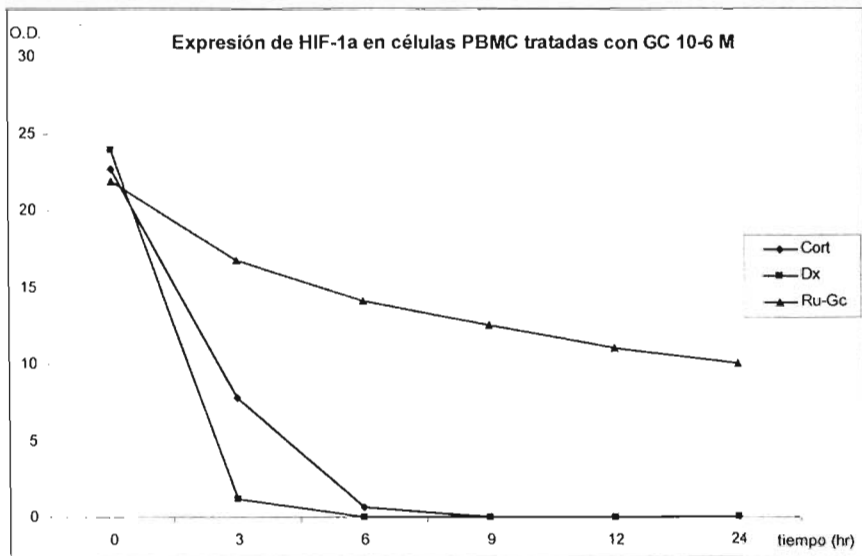


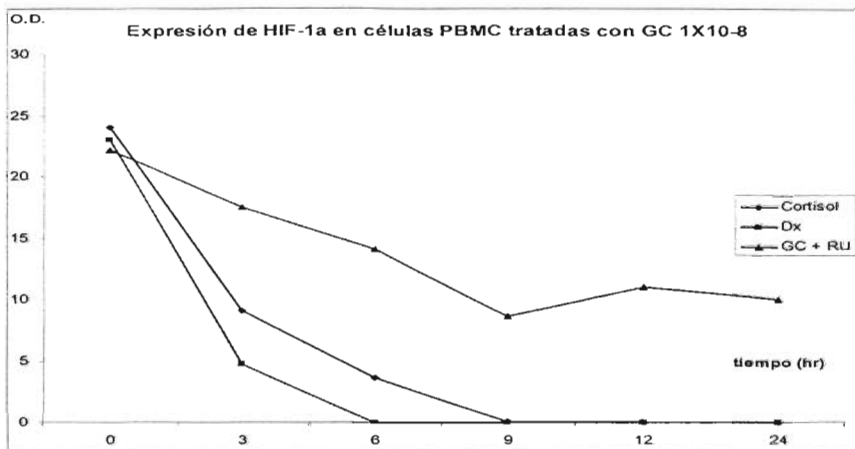
GRAFICO 5.10

Tiempo (h)	D.O. con Cort	D.O. con Dx	D.O. con Ru-Gc
0	22.7	23.9	21.9
3	7.8	1.2	16.8
6	0.6	0	14.1
9	0	0	12.5
12	0	0	11
24	0	0	10



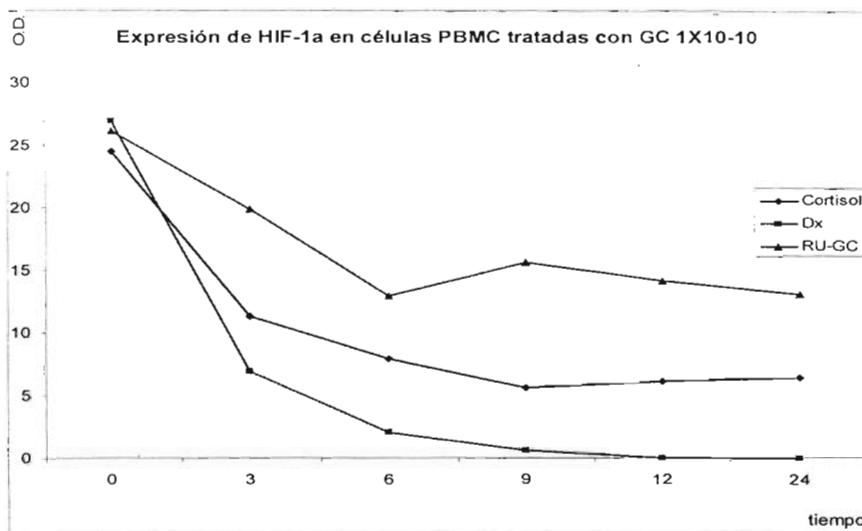
GRAFICA 5.11

Tiempo (h)	D.O. con Cort	D.O. con Dx	D.O. con Ru-Gc
0	24	23	22.2
3	9.06	4.7	17.51
6	3.66	0	14.1
9	0.09	0	8.62
12	0	0	11
24	0	0	10



GRAFICA 5.12

Tiempo (h)	D.O. con Cort	D.O. con Dx	D.O. con Ru-Gc
0	24.5	26.9	26.1
3	11.3	6.9	19.8
6	7.9	2.1	12.94
9	5.6	0.6	15.59
12	6.1	0	14.12
24	6.5	0	13.14



VI

DISCUSION

"Si en lo sucesivo, Teetetes, quieres producir, y en efecto produces frutos, serán mejores gracias a esta Discusión; y si permaneces estéril, no te harás pesado a los que conversen contigo, porque serás más tratable y más modesto, no crearás saber lo que no sabes".

Teetetes o de la Ciencia.

Platón

VI. DISCUSION

Como sabemos, las inmunofilinas manifiestan competencia por el sitio de unión al receptor de GC ¹²⁸ ¹²⁹. En los resultados se obtuvo una cinética de expresión de las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52, además de la proteína reguladora de hipoxia, HIF-1 α , bajo condiciones de estímulo por Glucocorticoides (GC).

Hay una mayor expresión de la FKBP52 en las primeras horas, alcanzando un máximo entre las 6 y las 9 horas, y después comienza a disminuir. La tendencia de disminución es más rápida con la FKBP52 que la que se presenta con la FKBP51.

La inmunofilina FKBP51 presenta una elevación en la expresión alcanzando un máximo entre las 6 y las 9 horas, pero no logra elevarse en este periodo de tiempo, mas que la FKBP52. Pasado el punto máximo, la decadencia en la expresión es menor a la FKBP52, manteniendo niveles más altos que esta ultima. Sin embargo esto no quiere decir que no hay una disminución, pero en este caso se sostiene una cantidad mínima que mantiene los niveles necesarios para controlar la cantidad de GR que le permiten a la célula mantener su viabilidad y no perder el estado estacionario que la llevaría a muerte celular.

Cuando se eleva la cantidad de inmunofilinas, es en un tiempo relativamente corto, tres horas, debido a que se requiere de una molécula que regule los elevados niveles de GC que la célula esta recibiendo como

estimulo, y esto se logra regulando al GR vía otras moléculas como son las chaperonas y las inmunofilinas^{44 45 46}. Al unirse a estas proteínas, se forma el complejo GR, el cual tiene la conformación adecuada para unirse a su ligando, el GC, e iniciar una respuesta. El receptor de glucocorticoide se disocia de las proteínas a las cuales se encuentra unido y se dimeriza con otro receptor promoviéndose la translocación a núcleo^{47. 51}.

A medida que aumenta la concentración de GC, la expresión de inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 aumenta debido a que se requiere modular la concentración de GC vía la unión al receptor que tenga la conformación adecuada y le permita dicha unión. La actividad chaperona de la inmunofilina, así como las chaperonas Hsp90, Hsp70 y la proteína p23, favorecen el plegamiento adecuado de la proteína GR, lo cual lleva a unirse con su ligando, el GC^{42 46}. En el momento que se agrega el inhibidor competitivo RU486, este se une al dominio de unión a GC y no permite que se asocie a su ligando promoviendo su inactividad^{61 62}. Por esta razón es que lo usamos como control, ya que es así como podemos monitorear que el efecto solo este dado por el estimulo y no por otras condiciones.

Se presenta una relación muy evidente entre la expresión de inmunofilinas, la concentración de GC y la muerte celular. Al aumentar la concentración de GC podemos ver que hay una mayor expresión de inmunofilinas y una mayor expresión de muerte celular por apoptosis. Al presentarse una mayor expresión de moléculas que favorecen la

translocación a núcleo, se inicia la síntesis de un conjunto de moléculas que son responsables de inducir la muerte celular, ya sea por la inhibición de moléculas antiapoptóticas como son Bcl-xS¹⁰, cIAP-2¹⁴, Bcl-2^{160 172}, cMyc²⁰, FKBP38¹⁷², o por inducción de moléculas proapoptóticas como son moléculas de la familia TNF, AP-1, IκB-α, granzima A, Bin¹⁷³, Bad, Bax¹⁶¹, además de que se sabe que se induce la muerte de un gran número de células como son monocitos²⁴, neutrofilos¹², linfocitos B²³ y linfocitos T⁸ entre otras, mediado por c-fos⁸, y mecanismos que aun no están completamente caracterizados pero que si esta registrada la muerte^{23 24 25 26}.

La protección se da cuando hay una sobre expresión de Bcl-xL y ahora sabemos que también por la expresión de la inmunofilina FKBP38 pero además de la FKBP51, la cual al tener una mayor constante de afinidad con el GR, no se disocia y esto favorece la estabilidad del complejo, lo cual no permite que se desacople y pueda migrar a núcleo^{109 113 114}. Además se sabe que esta inmunofilina no tiene la secuencia de aminoácidos que promueva la unión a la Dineína¹¹⁰, proteína motor que ayuda a la translocación de citosol a núcleo. La inmunofilina FKBP52 si contiene estas características, tanto la baja afinidad al unirse el complejo con el ligando GC, y así promoverse la disociación, como la unión a la proteína motor, la Dineína¹¹⁵. Estas características favorecen que la FKBP52 active al GR unido a su ligando. Por esta razón se cree que debe estar regulando el tránsito del receptor, del citoplasma al núcleo en coordinación con otras proteínas, como es la FKBP51, las chaperonas, y la Dineína.

Para que lo anterior se pueda llevar a cabo con mayor precisión es necesario que la FKBP52 se encuentre en cantidades suficientes que permitan la competencia adecuada por el sitio de unión y así poder regular con eficiencia la activación de receptor. Debido a esto, cuando se elevan las cantidades de GC, en las primeras horas de estrés, se eleva la cantidad de las dos inmunofilinas. La FKBP52 alcanza un nivel más alto de concentración ya que desplaza a la FKBP51 y favorece la translocación y posterior expresión de proteínas blanco inducidas por el dímero de GR unido a su ligando^{110 113 114}.

Pero después de las nueve horas comienza a descender más rápido que la FKBP51 ya que ésta mantendrá una estabilidad del complejo no permitiendo que se active¹¹². Debido a que las concentraciones de inmunofilinas obtenidas en este trabajo, a las 9 y a las 6 horas, son muy parecidas, podemos pensar que hay un máximo de expresión a las 8 horas, por lo que sería adecuado monitorear una cinética con rangos de tiempo más cercanos. Aunque esto no afecta nuestro análisis, ya que la tendencia de las dos inmunofilinas estudiadas se mantiene. Los tiempos de regulación de la expresión de inmunofilinas está asociado directamente con los ciclos circadianos del hombre. Por lo anterior podemos pensar que es posible que la FKBP51 sea un sistema amortiguador que retiene el GC en exceso no permitiendo que active el sistema de expresión que podría llevar a muerte ó a la desregulación de cualquier función de la célula, ya

sea sobrevivencia no controlada o muerte permanente de células en contacto con GC.

A pesar de que sabemos que no son los únicos efectos y mecanismos por los cuales se amplifica una señal por estas hormonas, si es necesario puntualizar que es uno de los principales mecanismos básicos de señalización que afectan directamente a la célula.

A medida que se mantiene a la célula con una alta concentración de hormona se observa que conforme pasa el tiempo se induce mayor muerte celular en cultivo primario. Las razones pueden deberse a que el volumen de mRNA de inmunofilina FKBP52 presente es elevado y se esta transcribiendo permanentemente lo que garantiza una alta concentración de proteína que ayudara a desplazar a la FKBP51 del complejo y la llevara a síntesis de otras proteínas vía la translocación a núcleo. También se esta dando la perdida de nutrientes y de condiciones básicas en el cultivo primario. Pero en tejido o en circulación el abastecimiento de estas condiciones se mantiene, así que hay otras causas que es necesario monitorear. Algunas proteínas que posiblemente podrían favorecer la sobrevivencia o la muerte son aquellas que están asociadas a condiciones de hipoxia^{123 124}.

Como se conoce ampliamente, al manifestarse condiciones de hipoxia en una célula, se inicia la transcripción de proteínas que permitan la posibilidad de sobrevivencia, de abastecimiento de energía y de

proliferación. Esto se lograría vía la síntesis de proteínas intermediarios de glucólisis, factores de crecimiento y factores de regulación de muerte¹³³.

El HIF-1 α es un indicador de hipoxia debido a que es sensible a modificaciones en la cantidad de oxígeno fisiológico. Esta proteína se ubiquitina al estar en contacto con oxígeno y a pesar de que es una proteína constitutiva, se degrada bajo condiciones normoxicas^{134 135 136}. Al disminuir la cantidad de oxígeno se mantiene estable pudiéndose unir a su homólogo HIF-1 β para formar el dímero HIF-1 el cual es activo. Este factor transloca a núcleo e inicia expresión de un amplio número de proteínas relacionadas a muerte celular, sobrevivencia y proliferación¹⁴¹.

Debido a que el exceso de glucocorticoides es considerado un agente etiológico que dispara la sobreproducción de ATP, lo que lleva a la célula a utilizar el oxígeno disponible de forma más rápida^{29 30}, podemos pensar que se producen pequeños rangos de carencia de oxígeno, incluso hasta llegar a hipoxia. Pero poco después del uso de este oxígeno disponible, secuestra oxígeno al interior de la célula para el abastecimiento adecuado de energía. Esto puede favorecer la normoxia rápidamente. Como el factor HIF-1 α es sensible a condiciones de normoxia e hiperoxia, y tiene un tiempo de vida menor a 5 minutos¹⁷⁴, inicia su degradación por el proteasoma previo proceso de ubiquitinación. Por esto es que en la medida en que aumenta la cantidad de GC presentes en la célula, aumenta la cantidad de oxígeno y se manifiesta una mayor degradación de este factor.

A pesar de que HIF-1 β es constitutivo y no se degrada por normoxia o hiperoxia, requiere de dimerizarse con HIF-1 α para formar el complejo activo¹⁴¹. Si este ultimo se degrada no hay translocación y expresión de los genes blanco. Es por esto que en la medida que aumenta la exposición a una cantidad inicial de GC, estos son utilizados por su receptor. A mayor tiempo, la regulación por FKBP51 favorece el secuestro del complejo receptor sin haber expresión de proteínas blanco, Esto lleva a tener una tendencia inclinada a condiciones de normoxia. En normoxia hay una expresión constitutiva basal del HIF-1 α que no estaría alterada. Durante las 24 horas de estudio no se alcanza la normoxia ya que no hay una recuperación absoluta en la concentración de este factor.

VII

CONCLUSIONES

"Sobre todo, serán siempre capaces de sentir en lo más hondo cualquier injusticia cometida contra cualquiera en cualquier parte del mundo. Es la cualidad más linda de un revolucionario"

Ernesto Che Guevara.

VII. CONCLUSIONES

La cinética de de expresión de RNA mensajero que presentaron las células mononucleares de sangre periférica en cultivo primario estimuladas con dexametasona y cortisol indican diferencias muy marcadas en la potencia del estímulo. La dexametasona presenta un efecto mas evidente en una relación de aproximadamente 2:1 con respecto al cortisol, bajo estas condiciones.

La FKBP52 desplaza a la FKBP51 en las primeras horas de activado el complejo receptor por el glucocorticoide.

La FKBP51 evita que la actividad del complejo receptor se mantenga por mucho tiempo logrando que no exista una transcripción permanente con efectos adversos para la célula.

La regulación de la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides esta asociada a la relación en la concentración de FKBP51/FKBP52. La inmunofilina 51 tiene mayor afinidad por el receptor no permitiéndole la migración al núcleo. La FKBP52 favorece la conformación adecuada para asociarse a proteínas motor que le permiten migrar a núcleo y realizar su función de transcripción.

Las célula PBMC al ser estimuladas con glucocorticoides no permiten la expresión de HIF-1 α por lo que se observa una disminución en la concentración de esta molécula con una tendencia inversa con respecto

al estímulo. A mayor concentración de glucocorticoides menor concentración de HIF-1 α , y a menor concentración se restablece la expresión de esta proteína.

Podemos pensar que el ciclo circadiano está íntimamente relacionado con los efectos fisiológicos de la célula ya que se observó que el pico más alto en la expresión de moléculas reguladoras se manifestó alrededor de las seis y las nueve horas.

El trabajo en cultivo primario podría ser confrontado con un trabajo en línea celular ya que estas últimas son celulares modificadas y podrían arrojar información importante para comprender mejor el comportamiento de la célula bajo esta clase de estímulo por glucocorticoides.

VIII

BIBLIOGRAFIA

Pues lo cierto es que salí de la casa de los doctos dando un portazo. Durante demasiado tiempo se sentó mi alma hambrienta a su mesa y yo no estoy preparado para el conocimiento como ellos, que piensan que conocer es algo así como cascar nueces. Amo la libertad y me gusta el aire libre que orea la tierra fresca, prefiero dormir sobre una piel de buey que sobre los honores y las dignidades de los doctos. Soy demasiado ardiente estoy demasiado quemado por mis propios pensamientos: a menudo no puedo respirar bien y tengo que salir al aire libre y escapar de los cuartos cubiertos de polvo.

Así habló Zaratustra
Friedrich Nietzsche.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ¹ William E. Rainey, Karla Saner and Bernard P. Schimmer, 2004. Adrenocortical cell lines • REVIEW ARTICLE. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228, pp. 23-38
- ² J.P. Herman and W.E. Cullinan, 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Trends Neurosci.* 20, pp. 78–84.
- ³ Manteuffel, G. Manteuffel, 2002. Central nervous regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare, *Arch. Tierz.* 45, pp. 575–595.
- ⁴ Turnbull and River, A.V. Turnbull and C. River, 1995. Regulation of the HPA axis by cytokines, *Brain Res. Bull.* 9, pp. 253–275.
- ⁵ Black and Garbutt, P.H. Black and L.D. Garbutt, 2002. Stress, inflammation and cardiovascular disease, *J. Psychosom. Res.* 52, pp. 1–23.
- ⁶ Sikora, E., et al., 1996. Interference between DNA binding activities of AP-1 and GR transcription factors in rat thymocytes undergoing dexamethasone-induced apoptosis. *Acta Biochem. Pol.* 43, 721– 731.
- ⁷ Pruschy, M., et al., 1997. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 519–524.
- ⁸ Feng, Z., et al., 1995. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J. Biol. Chem.* 131, 1095–1103.
- ⁹ Chang, T.C., et al., 1997. Dexamethasone suppresses apoptosis in human gastric cancer cell line through modulation of bcl-x gene expression. *FEBS Lett.* 415, 11–15.
- ¹⁰ Yamamoto, M., et al., 1998. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* 27, 959–966.
- ¹¹ Huang, S.J., et al., 1999. Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *FASEB J.* 13, 467–476.
- ¹² Sasson, R., et al., 2001a. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology* 142, 802–811.
- ¹³ Wen, L.P., et al., 1997. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN- γ and Fas. *Am. J. Physiol.* 273, L921–L929.
- ¹⁴ Evans-Storms, R.B., et al., 2000. Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells the role of nuclear factor-kB. *Endocrinology* 141, 1854–1862.
- ¹⁵ Chauhan, D., et al., 1997. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene* 15, 837–843.
- ¹⁶ Horigome, A., et al., 1997. Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 37, 87–94.
- ¹⁷ Zhang, J.P., et al., 2000. Role of caspases in dexamethasone-induced apoptosis and activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in human eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 122, 20–27.
- ¹⁸ Chae, H.J., et al., 2000. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in osteoblasts: possible role for ceramide. *Endocrinology* 141, 2904–2913.

-
- ¹⁹ Miyoshi, H., et al., 1997. Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with a t (8; 21) chromosome translocation. *Leuk. Res.* 21, 45–50.
- ²⁰ Borski, R.J., et al., 2000. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 427–436.
- ²¹ Mebmer, U.K., et al., 1999. Glucocorticoids potently blocks tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1633–1640.
- ²² Andreau, K., et al., 1998. Induction of apoptosis by dexamethasone in the B cells lineage. *Immunopharmacology* 40, 67–76.
- ²³ Schmidt, M., et al., 1999. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 β . *J. Immunol.* 163, 3484–3490.
- ²⁴ Waddell, B.J., et al., 2000. Apoptosis in rat placenta is Zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biol. Reprod.* 63, 1913–1917.
- ²⁵ Cox, G., 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 154, 4719–4725.
- ²⁶ Ellen Kanitz, Winfried Otten and Margret Tuchscherer. 2005. Central and peripheral effects of repeated noise stress on hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis in pigs ARTICLE. *Livestock Production Science*, In Press, Corrected Proof, Available online 22 January
- ²⁷ Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P., 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245–261.
- ²⁸ McKenna, N.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W., 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, pp. 321–344.
- ²⁹ Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgerit F. 2000. Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states. *Bioscience Rep*; 20:289–302.
- ³⁰ Kuhnke A, Burmester GR, Krauss S, Buttgerit F. 2003. Bioenergetics of immune cells to assess rheumatic disease activity and efficacy of glucocorticoid treatment. *Ann Rheum Dis.* Feb;62(2):133-9.
- ³¹ Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein. 2002. SR: Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*, 16:61-71.
- ³² Barnes PJ, Adcock IM: How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* 2003, 139:359-370.
- ³³ Smyth GP, Stapleton PP, Freeman TA, Concannon EM, Mestre JR, Duff M, Maddali S, Daly JM. 2004. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *J Surg Res*, 116:253-261.
- ³⁴ Nicolas J Goulding The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation — a four-ring circus • REVIEW ARTICLE. 2000. *Current Opinion in Pharmacology*, Volume 4, Issue 6, December 4, Pages 629-636
- ³⁵ Necela BM, Cidlowski JA. 2004. A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J Biol Chem.* Sep 17;279(38):39279-88. Epub 2004 Jun 25.
- ³⁶ Yudt, M.R., Cidlowski, J.A., 2001. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 15 (7), 1093–1103.

- ³⁷ Randy K. Bledsoe, Valerie G. Montana, Thomas B. Stanley, Chris J. Delves, Christopher J. Apolito, David D. McKeec. 2002. Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. *Cell*, Vol. 110, 93–105, July 12. .
- ³⁸ Kumar, R., Thompson, E.B.. 2003. Transactivation functions of the Nterminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 17 (1), 1–10.
- ³⁹ Kumar, R., Thompson, E.B.. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64 (5), 310–319.
- ⁴⁰ Coghlan, M.J., Elmore, S.W., Kym, P.R., Kort, M.E., 2003. The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor. *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (14), 1617–1635
- ⁴¹ Smoak KA, Cidlowski JA. 2004. Related Articles, Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev.* Oct-Nov;125(10-11):697-706.
- ⁴² Cheung and Smith, 2000. J. Cheung and D.F. Smith. 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol. Endocrinol.* 14, pp. 939–946.
- ⁴³ DeFranco et al.. 1991. D.B. DeFranco, M. Qi, K.C. Borror, M.J. Garabedian and D.L. Brautigan. 1991. Protein phosphatase types 1 and/or 2A regulate nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptors. *Mol. Endocrinol.* 5, pp. 1215–1228.
- ⁴⁴ Pratt, 1993. W.B. Pratt. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268 (), pp. 21455–21458.
- ⁴⁵ Dittmar, K.D., Demady, D.R., Stancato, L.F., Krishna, P., Pratt,W.B., 1997. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor. hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J. Biol. Chem.* 272 (34), 21213–21220.
- ⁴⁶ Dittmar, K.D., Banach, M., Galigniana, M.D., Pratt,W.B., 1998. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 273 (13), 7358–7366.
- ⁴⁷ Madan and DeFranco, 1993. A.P. Madan and D.B. DeFranco. 1993. Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (), pp. 3588–3592.
- ⁴⁸ Cadepond et al., 1991. F. Cadepond, G. Schweizer-Groyer, I. Segard-Maurel, N. Jibard, S.M. Hollenberg, V. Giguère, R.M. Evans and E.-E. 1991. Baulieu, Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* 266, pp. 5834–5841.
- ⁴⁹ Howard and Distelhorst, 1988. K.J. Howard and C.W. Distelhorst. 1988. Evidence for intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263(), pp. 3474–3481.
- ⁵⁰ Picard and Yamamoto, 1987. D. Picard and K.R. Yamamoto, Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6 (1987), pp. 3333–3340.
- ⁵¹ G. Pelaia, A. Vatrella, G. Cuda, R. Maselli and S.A. Marisco. 2003. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases, *Life Sci* 72, pp. 1549–1561.
- ⁵² Liu and DeFranco, 2000. J. Liu and D.B. DeFranco. 2000, Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol. Endocrinol.* 14 (), pp. 40–51.
- ⁵³ Brian M. Necela and John A. Cidlowski. 2004. A Single Amino Acid Change in the First Zinc Finger of the DNA Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor Regulates Differential Promoter Selectivity. *Vol. 279, No. 38. Issue of September 17, pp. 39279–39288*

-
- ⁵⁴ Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 71 (1), 9–15.
- ⁵⁵ Jantzen, H.M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., Schutz, G., 1987. Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49 (1), 29–38.
- ⁵⁶ Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (London)* 94 (6), 557–572.
- ⁵⁷ De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Haegeman, G., 2003. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappa B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 24 (4), 488–522.
- ⁵⁸ Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., Cato, A.C., 2001. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 20 (24), 7108–7116.
- ⁵⁹ Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 71 (1), 9–15.
- ⁶⁰ Christian Honer, Kiyeon Nam, Cynthia Fink, Paul Marshall. 2003. Glucocorticoid Receptor Antagonism by Cyproterone Acetate and RU486. *Mol Pharmacol* 63:1012–1020
- ⁶¹ Philibert D and Teutsch G (1990) RU 486 development. *Science (Wash DC)* 247:622.
- ⁶² Teutsch G, Gaillard-Moguilowsky M, Lemoine G, Nique F, and Philibert D (1991) Design of ligands for the glucocorticoid and progestin receptors. *Biochem Soc. Trans* 19:901–908.
- ⁶³ Schiene, C. and Fischer, G., 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 10, pp. 40–45.
- ⁶⁴ Callebaut, I., Renoir, J.M., Lebeau, M.C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.E. et al., 1992. An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, pp. 6270–6274.
- ⁶⁵ Nakao, K., Myers, J.E. and Faber, L.E., 1984. Development of a monoclonal antibody to the rabbit 8.5S uterin progestin receptor. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 63, pp. 33–40.
- ⁶⁶ Tai, P.K.K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N.G., Duhring, J.L. and Faber, L.E., 1986. A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, androgen, and glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 25, pp. 5269–5275.
- ⁶⁷ Sanchez, E.R., Faber, L.E., Henzel, W.J. and Pratt, W.B., 1990. The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* 29, pp. 5145–5152.
- ⁶⁸ Renoir, J.M., Radanyi, C., Faber, L.E. and Baulieu, E.-E., 1990. The non-DNA-binding heterooligomeric form mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *Journal of Biological Chemistry* 265, pp. 10740–10745.
- ⁶⁹ Sanchez, E.R., 1990. Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* 265, pp. 22067–22070.
- ⁷⁰ Fretz, H., Albers, M.W., Galat, A., Slandaert, R.F., Lane, W.S., Burakoff, S.J. et al., 1991. Rapamycin and FK506 binding proteins (immunophilins). *Journal of American Chemical Society* 113, pp. 1409–1411.

- ⁷¹ Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrichson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A. et al., 1992. The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *Journal of Biological Chemistry* 267, pp. 2868–2871.
- ⁷² Fai, P.K., Albers, M.W., Chang, H., Faber, L.E. and Schreiber, S.L., 1992. Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* 256, pp. 1315–1318.
- ⁷³ Baughman, G., Wiederrecht, G.J., Campbell, N.F., Martin, M.M. and Bourgeois, S., 1995. FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 15, pp. 4395–4402.
- ⁷⁴ Peattie, D.A., Harding, M.W., Fleming, M.A., Decenzo, M.T., Lippke, J.A., Livingston, D.J. et al., 1992. Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, pp. 10974–10978.
- ⁷⁵ Wiederrecht, G., Hung, S., Chan, H.K., Marcy, A., Martin, M., Calaycay, J. et al., 1992. Characterization of high molecular weight FK506 binding activities reveals a novel FK506 binding protein as well as a protein complex. *Journal of Biological Chemistry* 267, pp. 21753–21760.
- ⁷⁶ Chambraud, B., Rouviere-Fourmy, N., Radanyi, C., Hsiao, K., Peattie, D.A., Livingston, D.J. et al., 1993. Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of Ppase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196, pp. 160–166.
- ⁷⁷ Qing, K., Hansen, J., Weigel-Kelley, K.A., Tan, M., Zhou, S. and Srivastava, A., 2001. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression. *Journal of Virology* 75, pp. 8968–8976.
- ⁷⁸ Lebeau, M.C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L.E., Renoir, J.M., Radanyi, C. et al., 1992. P59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry* 267, pp. 4281–4284.
- ⁷⁹ Yem, A.W., Reardon, I.M., Leone, J.W., Heinrichson, R.L. and Deibel Jr., M.R., 1993. An active FK506-binding domain of 17000 Daltons is isolated following limited proteolysis of chicken thymus HSP56. *Biochemistry* 32, pp. 12571–12576.
- ⁸⁰ Li, P., Ding, Y., Wu, B., Shu, C., Shen, B. and Rao, Z., 2003. Structure of the N-terminal domain of human FKBP52. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 59, pp. 16–22.
- ⁸¹ Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T. et al., 2003. The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO Journal* 22, pp. 1158–1167.
- ⁸² Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Kanelakis, K.C., Radanyi, C., Renoir, J.M. and Pratt, W.B., 1999. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *Journal of Biological Chemistry* 274, pp. 36980–36986.
- ⁸³ Galigniana, M.D., Radanyi, C., Renoir, J.M., Housley, P.R. and Pratt, W.B., 2001. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* 276, pp. 14884–14889.
- ⁸⁴ Le, B.S., Renoir, J.M., Radanyi, C., Chambraud, B., Joulin, V., Catelli, M.G. et al., 1993. The mammalian heat shock protein binding immunophilin (p59/HBI) is an ATP and GTP binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195, pp. 600–607.
- ⁸⁵ Miyata, Y., Chambraud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M.C., Renoir, J.M. et al., 1997. Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94, pp. 14500–14505.

- ⁸⁶ Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M. and Pratt, W.B., 1995. Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Molecular Endocrinology* 9, pp. 1549–1560.
- ⁸⁷ Radanyi, C., Chambraud, B. and Baulieu, E.E., 1994. The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, pp. 11197–11201.
- ⁸⁸ Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S. and Chinkers, M., 1999. Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *Journal of Biological Chemistry* 274, pp. 20060–20063.
- ⁸⁹ Goebel, M. and Yanagida, M., 1991. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends in Biochemical Sciences* 16, pp. 173–177.
- ⁹⁰ Scheffler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H. et al., 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, pp. 199–210.
- ⁹¹ Bose, S., Weikl, T., Bugl, H. and Buchner, J., 1996. Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* 274, pp. 1715–1717.
- ⁹² Pirkl, F., Fischer, E., Modrow, S. and Buchner, J., 2001. Localization of the chaperone domain of FKBP52. *Journal of Biological Chemistry* 276, pp. 37034–37041.
- ⁹³ Massol, N., Lebeau, M.C., Renoir, J.M., Faber, L.E. and Baulieu, E.E., 1992. Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, pp. 1330–1335.
- ⁹⁴ Ning, Y.M. and Sanchez, E.R., 1995. Evidence for a functional interaction between calmodulin and the glucocorticoid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208, pp. 48–54.
- ⁹⁵ Ning, Y.M. and Sanchez, E.R., 1996. In vivo evidence for the generation of a glucocorticoid receptor-heat shock protein-90 complex incapable of binding hormone by the calmodulin antagonist phenoxybenzamine. *Molecular Endocrinology* 10, pp. 14–23.
- ⁹⁶ Cheung-Flynn, J., Roberts, P.J., Riggs, D.L. and Smith, D.F., 2003. C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *Journal of Biological Chemistry* 278, pp. 17388–17394.
- ⁹⁷ Pratt, W.B. and Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrinological Review* 18, pp. 306–360.
- ⁹⁸ Nair, S.C., Toran, E.J., Rimerman, R.A., Hjermstad, S., Smithgall, T.E. and Smith, D.F., 1996. A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones* 1, pp. 237–250.
- ⁹⁹ Czar, M.J., Owens-Grillo, J.K., Dittmar, K.D., Hutchison, K.A., Zacharek, A.M., Leach, K.L. et al., 1994. Characterization of the protein-protein interactions determining the heat shock protein (hsp90 hsp70 hsp56) heterocomplex. *Journal of Biological Chemistry* 269, pp. 11155–11161.
- ¹⁰⁰ Czar, M.J., Owens-Grillo, J.K., Yem, A.W., Leach, K.L., Deibel Jr., M.R., Welsh, M.J. et al., 1994. The hsp56 immunophilin component of untransformed steroid receptor complexes is localized both to microtubules in the cytoplasm and to the same nonrandom regions within the nucleus as the steroid receptor. *Molecular Endocrinology* 8, pp. 1731–1741.
- ¹⁰¹ Perrot-Applanat, M., Cibert, C., Geraud, G., Renoir, J.M. and Baulieu, E.E., 1995. The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *Journal of Cell Sciences* 108, pp. 2037–2051.

-
- ¹⁰² Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Murphy, P.J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J.M. et al., 2002. Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* 41, pp. 13602–13610.
- ¹⁰³ Davies, T.H., Ning, Y.M. and Sanchez, E.R., 2002. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *Journal of Biological Chemistry* 277, pp. 4597–4600.
- ¹⁰⁴ Gold, B.G., Densmore, V., Shou, W., Matzuk, M.M. and Gordon, H.S., 1999. Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, pp. 1202–1210.
- ¹⁰⁵ Qing, K., Li, W., Zhong, L., Tan, M., Hansen, J., Weigel-Kelley, K.A. et al., 2003. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines in vitro and transgenic mice in vivo. *Journal of Virology* 77, pp. 2741–2746.
- ¹⁰⁶ Scammell, J. G., Denny, W. B., Valentine, D. L., and Smith, D. F. (2001) *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 152–165
- ¹⁰⁷ Davies, T. H., Ning, Y. M., and Sanchez, E. R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 4597–4600
- ¹⁰⁸ Riggs, D. L., Roberts, P. J., Chirillo, S. C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., and Smith, D. F. (2003) *EMBO J.* 22, 1158–1167
- ¹⁰⁹ Denny, W. B., Valentine, D. L., Reynolds, P. D., Smith, D. F., and Scammell, J. G. (2000) *Endocrinology* 141, 4107–4113
- ¹¹⁰ Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J. M., and Pratt, W. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36980–36986
- ¹¹¹ De Kloet, E. R. (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 405, 187–198
- ¹¹² Paskitti, M. E., McCreary, B. J., and Herman, J. P. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* 80, 142–152
- ¹¹³ Baughman, G., Harrigan, M. T., Campbell, N. F., Nurrish, S. J., and Bourgeois, S. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5, 637–644
- ¹¹⁴ Baughman, G., Wiederrecht, G. J., Campbell, N. F., Martin, M. M., and Bourgeois, S. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 4395–4402
- ¹¹⁵ Theo Rein, Gabriela M. Wochnik, Joëlle Rüegg, G. Alexander Abel, Ulrike Schmidt, Florian Holsboer. FK506-binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.*, February 11, 2005., 280(6): 4609-4616.
- ¹¹⁶ Barent, R. L., Nair, S. C., Carr, D. C., Ruan, Y., Rimerman, R. A., Fulton, J., Zhang, Y., and Smith, D. F. (1998) *Mol. Endocrinol.* 12, 342–354
- ¹¹⁷ Semenza GL. 2000. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res.* 1:159–162
- ¹¹⁸ John A. Cidlowski. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. Review, *Mechanisms of Ageing and Development* 125 697–706
- ¹¹⁹ **Quiroz Cabañas Yuvicela. 2005. Diseño elaborado en base a la información de la literatura referida.**

- ¹²⁰ Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*. 1998 Dec 31;17(26):3401-15.
- ¹²¹ Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct; 3(10):721-32. Review.
- ¹²² Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5754-7.
- ¹²³ Aragones J, Jones DR, Martin S, San Juan MA, Alfranca A, Vidal F, Vara A, Merida I, Landazuri MO. Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10548-55. Epub 2001 Jan 02.
- ¹²⁴ Santore MT, McClintock DS, Lee VY, Budinger GR, Chandel NS. Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr; 282(4):L727-34.
- ¹²⁵ Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):38-47. Review.
- ¹²⁶ Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, Fisher TC. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 Aug 30;345(1313):319-25. Review.
- ¹²⁷ Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998 Jul 30;394(6692):485-90. Erratum in: *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525. Keshet E [corrected to Keshert E].
- ¹²⁸ Moritz W, Meier F, Stroka DM, et al. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression. *FASEB J* 2002;16:745-7.
- ¹²⁹ Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7
- ¹³⁰ Salceda S, Beck I, Caro J. Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia. *Arch Biochem Biophys* 1996;334:389-94.
- ¹³¹ Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002;64:993-8.
- ¹³² Krieg M, Haas R, Brauch H, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 2000;19:5435-43.
- ¹³³ Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000, 88:1474-1480.
- ¹³⁴ Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C-elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43-54.
- ¹³⁵ Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O-2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
- ¹³⁶ Bruck RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-40.
- ¹³⁷ Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14:34-44.

- ¹³⁸ Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, et al. Jab1 interacts directly with HIF-1 α and regulates its stability. *J Biol Chem* 2002;277:9-12.
- ¹³⁹ Miller DL, Dibbens JA, Damert A, et al. The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site. *FEBS Lett* 1998;434:417-20.
- ¹⁴⁰ Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 2002;13:1792-801.
- ¹⁴¹ Kvietikova J, Wenger RH, Marti HH, et al. The transcription factors Atf-1 and Creb-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (Hif-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4542-50.
- ¹⁴² Glüksmann, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26, 59-86.
- ¹⁴³ Jacobson M.D., Weil, M. & Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- ¹⁴⁴ Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- ¹⁴⁵ Raff, M.C. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119-122.
- ¹⁴⁶ Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S.R., Davies, T.J., Gardener, R.L., Raff, K.D. & Raff, M.C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* 133, 1053-1059.
- ¹⁴⁷ Vaux, D.L., Weissman, I.L. & Kim, S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258, 1955-1957.
- ¹⁴⁸ Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell* 76, 665-676.
- ¹⁴⁹ Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- ¹⁵⁰ Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calycay, J.R., Champan, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, J.F., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, Y., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M.M., Mumford, R.A., Schmidt, J.A. & Tocci, M.J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- ¹⁵¹ Yuan, J.Y., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, M.H. & Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 α converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- ¹⁵² Ellis, R.E., Jacobson, D.M. & Horvitz, H.R. (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 79-94.
- ¹⁵³ Xue, D. & Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377, 248-251.
- ¹⁵⁴ Thornberry, Nancy A. Lazebnik Yuri. Caspases: Enemies Within. *Science*. 1998 August 28, Vol. 281:1312-1316
- ¹⁵⁵ Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 299-306.
- ¹⁵⁶ Salvesen, G.S & Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- ¹⁵⁷ Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S. (1998). Properties of caspases. *Biochem et Biophys Acta* 1387, 17-31.

-
- ¹⁵⁸ Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676
- ¹⁵⁹ Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1998). *Bcl-2* family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395-419.
- ¹⁶⁰ Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The *Bcl-2* protein family: arbiters of cellular survival. *Science* 281, 1322-1326.
- ¹⁶¹ Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993). *Bcl-2* heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, *Bax*, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- ¹⁶² Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- ¹⁶³ Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. & Dixit, V.M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cellular death. *Science* 275, 1122-1126.
- ¹⁶⁴ Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N. & Nuñez, G. (1998). *Bcl-X_L* interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4386-4391.
- ¹⁶⁵ Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
- ¹⁶⁶ Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- ¹⁶⁷ Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312
- ¹⁶⁸ Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- ¹⁶⁹ Todd H. Davies, Yang-Min Ning,† and Edwin R. Sánchez. 2005. Differential Control of Glucocorticoid Receptor Hormone-Binding Function by Tetratricopeptide Repeat (TPR) Proteins and the Immunosuppressive Ligand FK506. *Biochemistry*, 44, 2030-2038
- ¹⁷⁰ Theo Rein. and Gabriela M. 2005. FK506-binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. Vol. 280, No. 6, Issue of February 11, pp. 4609-4616,
- ¹⁷¹ Jansen M. Vermer H. 2003, Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Jan;88(1):277-288
- ¹⁷² **Espinosa Pérez Areli. Modulación de la participación de la inmunofilina FKBP38 en la apoptosis de células PBMC inducida por glucocorticoides. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM, Facultad de Química. 2005. p. 68.**
- ¹⁷³ S. Schmidt, J. Rainer. Glucocorticoid-Induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanism and clinical relevance. (2004) *Cell Death and Differentiation* 11, S45-S55.
- ¹⁷⁴ Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. Activation of Hypoxia-inducible Transcription Factor Depends Primarily upon Redox-sensitive Stabilization of Its α Subunit. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 32253-32259