



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EL PAPEL DE BCL-3 EN LA
APOPTOSIS INDUCIDA POR UVB

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. INGRID LETICIA GARCIA TORRES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Mi más profundo agradecimiento a CONACYT por haberme otorgado la beca de Posgrado de Excelencia durante el desarrollo de la Maestría. Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el número de registro 189839.

Agradezco de manera muy especial a mi comité tutorial: la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dr. Julio Moran Andrade, y el Dr. Luis A. Herrera Montalvo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

Sinodales:

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Dr. Julio Morán Andrade

Dr. Luis A. Herrera Montalvo

Dra. Ana María Fernández Presas

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, mi asesora de tesis, por conducirme en el camino de la investigación, por compartir conmigo su experiencia y conocimientos, así como ayudarme en la dirección de este proyecto. Al Dr. Jorge Meléndez por permitirme hacer mi tesis en su laboratorio, además de compartirme sus conocimientos y su ayuda para la realización de este proyecto.

A mis sinodales: Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Luis A. Herrera Montalvo, Dra. Ana María Fernández Presas y la Dra. María de Lourdes Segura Valdez por todo su apoyo en la realización de mi tesis, comentarios y por compartir conmigo sus conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio: Magali, Julia, Alma, Gisela, Floria, Rubén y Juan Carlos.

Al Instituto Nacional de Cancerología y al personal de la dirección de apoyo académico.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Otra vez quiero dedicar mi trabajo a mi madre la Sra. Silvia Torres Mora, por su ayuda en todo. Mami sin ti no seria nada.

A mi papa y a mis hermanos: Rodolfo, Yolo, Hugo y Edgar

A mi tia la Sra. Francisca Moran (Paquita).

Y por supuesto a Julio (Jul), gracias por apoyarme en todo y por ser parte esencial de mi vida. Por llenarme de amor y entusiasmo para llevar a cabo nuevos retos. Besitos

A mis amigos y a mis nuevos amigos.

INDICE

	Página
Índice.....	I
Índice de Figuras y Tablas.....	II
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
I. Introducción.....	1
1.1 Apoptosis.....	1
1.2 Factor NFkappa B.....	3
1.3 Bcl-3.....	6
1.4 Radiación UV.....	7
1.4.1 UVB.....	8
II. Antecedentes.....	10
III. Hipótesis.....	11
IV. Objetivos.....	11
V. Metodología.....	12
VI. Resultados.....	19
VII. Discusión.....	33
VIII. Conclusiones.....	40
IX. Perspectivas.....	41
X. Anexo... ..	42
XI. Literatura Citada.....	44

RESUMEN

El proto-oncogen Bcl-3 es una proteína miembro de la familia de los inhibidores (I- κ B) del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Kappa B), pero su función es activar sus genes regulados por NF- κ B. Bcl-3 tiene diferentes papeles en el control del ciclo celular, proliferación celular, apoptosis y reparación de DNA. El papel de Bcl-3 en la apoptosis inducida por la luz Ultravioleta B (UVB) no está establecido. La UVB es el factor de riesgo más importante para el cáncer de piel debido a su habilidad para inducir daño al DNA y mutaciones; y la desregulación en la apoptosis inducida por UVB representa un riesgo para mutagenesis. En este proyecto, se determinó el mecanismo por el cual Bcl-3 actúa en la apoptosis inducida por UVB en células HeLa. Los datos presentados demuestran que la reducción en los niveles de Bcl-3 sensibiliza a las células HeLa a apoptosis por irradiación UVB. Se determinó que la apoptosis desencadenada por la UVB, se lleva a cabo por ambas vías apoptóticas (vía intrínseca y extrínseca) y Bcl-3 modula ambas vías. Además, se reveló que el principal mecanismo por el cual Bcl-3 podría estar actuando es por regulación de p53, asimismo de otras proteínas involucradas en la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular; así como los mecanismos de reparación al DNA (Ref-1, YY1, DNA-PK, Survivina y RunX2). Todos los resultados observados en forma conjunta sugieren que Bcl-3 contribuye a la sensibilidad de células HeLa a la apoptosis inducida por UVB. Los resultados del presente trabajo permiten concluir que la proteína reguladora Bcl-3, tiene un papel importante la regulación de la apoptosis inducida por UVB. Este trabajo, proporciona una herramienta crítica de los efectos funcionales de Bcl-3 en células de cáncer humano.

ABSTRACT

The proto-oncogene Bcl-3 is a member protein of inhibitors (I- κ B) family of the nuclear transcription factor NF- κ B, but its function is activate its target genes. Bcl-3 has diferents papers in cell cycle control, proliferation, apoptosis and DNA repair. However, Bcl-3 role in apoptosis induced for Ultraviolet B (UVB) has not been established. UVB is the most important environmental risk factor for skin cancers because its ability to induce DNA damage and mutations; and disregulation in UVB induced apoptosis in cells HeLa. The data presents in this work show the reduction Bcl-3 nivels in HeLa cells sensibility to apoptosis for UVB irradiation. The UVB induce apoptosis for either apoptotics pathways (intrinsic and extrinsic), and Bcl3-protein modulate diferents points of both pathways. Moreover, mechanisms principal can be performance for p53 regulation, also other proteins involved in apoptosis, proliferation and cell differentiation, thus like DNA repair mechanism (Ref-1, YY1, DNA-PK, Survuvin and RunX2). All of the findings observed together suggest that Bcl-3 contribute to HeLa cells sensibility to UVB induce apoptosis. The results our work permit to conclude Bcl-3 regulator protein, has a important role in the regulation in UVB induced apoptosis. This work support proportion a tool the funtion effects Bcl-3 in cancer human cells.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Apoptosis.

En 1972, la palabra apoptosis fue introducida formalmente para describir una forma especial de muerte celular [1]. La apoptosis sirve a los organismos multicelulares para eliminar células que han cumplido con su función y no son necesarias y, de manera más importante, ayuda a eliminar células que han sufrido mutaciones y cambios fenotípicos potencialmente dañinos para el organismo [2,3].

La apoptosis es un mecanismo esencial en el cual una célula muere de forma activa, esto es, se prepara molecular y bioquímicamente para tal evento. Morfológicamente, la célula que ha recibido una señal que le induce a la apoptosis pierde contacto con las células vecinas y uno de los primeros cambios que exhiben las células consiste en la condensación del citoplasma y reducción del volumen celular, acompañados de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa seguida de invaginaciones de la envoltura nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. En etapas posteriores, hay reducción del potencial transmembranal en la mitocondria, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, la membrana celular sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando vesículas que contienen parte de la cromatina y organelos celulares intactos rodeados de

membrana plasmática íntegra. A estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados por células adyacentes o macrófagos [3,4].

Se han descrito de manera general dos vías principales de apoptosis, las cuales no son excluyentes. La primera, denominada vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación de factores mitocondriales (ej. citocromo C), lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de proteasas apoptóticas, Apaf-1, en presencia de dATP o ATP y se forma un complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa la caspasa -9. Esto, a su vez activa a las caspasas -3, -6 y -7 que finalmente induce los cambios morfológicos apoptóticos [5]. Las caspasas -3, -6 y -7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que cortan diversos substratos clave para la función celular, como la lámina B nuclear, DNAsas, etc. Entre estos substratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la envoltura nuclear y las encargadas de la reparación del DNA entre otras [6,7].

La vía apoptótica extrínseca se desencadena por una señal pro-apoptótica que involucra los receptores de muerte de la superficie celular (ej. TNF, FAS, etc.). Esta vía puede ejemplificarse por la unión de Fas a su ligando. FasL es un trímero que al unirse con Fas induce la trimerización de este. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (complejo de señalización que induce a muerte)

al dominio citoplásmico de Fas. El DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la pro-caspasa -8 favoreciendo su auto-activación; la caspasa -8 puede entonces activar a las caspasas efectoras -3, -6 y -7. Por otro lado, la caspasa -8 puede activar a Bid (miembro de la familia de Bcl-2) y este inducir la liberación del citocromo c y activar así a la vía intrínseca [8].

La familia de las caspasas, son clave durante la mayoría de los procesos apoptóticos. Una característica importante de la familia de caspasas es que son capaces de autoactivarse (caspasas iniciadoras) y de activarse entre ellas formando una cascada de respuesta apoptótica, y por lo tanto, también constituyen un punto importante de control de la apoptosis. Estas se regulan negativamente por una familia de proteínas anti-apoptóticas denominadas IAPs (proteínas inhibitorias de apoptosis) que se unen directamente y bloquean su activación [9].

1.2 Factor Nuclear NF- κ B.

Las células eucariontes poseen distintas vías de transducción de señales que acoplan estímulos del medio a cambios específicos en la expresión del gene. Una de estas vías, es regulada por la familia de factores de transcripción NF- κ B, que es crítica para la activación de la expresión de genes que están involucrados en el control de la respuesta inflamatoria e inmune, la defensa del hospedero, proliferación celular y diferenciación, apoptosis y tumorigénesis [10]. El descubrimiento de varias proteínas regulatorias clave dentro de esta vía han provisto la idea de los mecanismos por los cuales NF- κ B ejecuta un acoplamiento

específico de distintos procesos celulares. La regulación aberrante de la activación de NF- κ B ha sido asociada con la patogénesis de varias enfermedades, incluyendo autoinmunidad, artritis, asma y cáncer [11].

La familia de NF- κ B está compuesta por 5 proteínas: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). De estos, NF- κ B1 y NF- κ B2 sufren un rompimiento proteolítico en la región del carboxilo terminal, resultando p50 y p52, respectivamente que les proporciona la unión específica al DNA. La familia de NF- κ B contiene un dominio conservado de 300 aminoácidos en su amino terminal llamado Dominio de Homología a Rel (RHD) que es el responsable para la unión al DNA, dimerización, y asociación con las proteínas inhibidoras I κ B. De éstas, sólo RelA, RelB, c-Rel contienen un dominio de transactivación (TAD) dentro de su región carboxilo terminal, el cual interactúa directamente con varios co-activadores o componentes de la maquinaria de transcripción y estimular la transcripción [12]. Cada dímero de NF- κ B tiene distinto potencial transcripcional, siendo algunas combinaciones más activas que otras y utilizados en distintas respuestas. El heterodímero más abundante es el formado por p50/p65. Por otro lado, se sabe que los homodímeros p50/p50 y p52/p52 funcionan para reprimir la transcripción de genes blanco de NF- κ B [13].

Los dímeros de NF- κ B se localizan en el citoplasma en un estado inactivo y necesitan un estímulo para translocarse al núcleo. La acción de NF- κ B está regulada por sus proteínas inhibidoras - κ B, las I κ Bs que en células no estimuladas, los dímeros de NF- κ B son secuestrados en el citoplasma a través de la interacción con estas proteínas inhibidoras. Esta familia de proteínas incluye:

I κ B- α (37 kDa), I κ B- β (45 kDa), I κ B- γ , I κ B- ϵ (45-50 kDa) y Bcl-3 (60 kDa), y los dominios inhibidores de las proteínas precursoras p100 y p105 [14]. Los miembros de la familia I κ B contienen un dominio de repeticiones de ankirina, que regulan su localización subcelular, así como también su unión al DNA y su actividad transcripcional de las proteínas NF- κ B. Las proteínas I κ Bs se unen a NF- κ B y su localización nuclear (NLS) es enmascarada, y consecuentemente no pueden translocarse al núcleo ni unirse al DNA [12, 14].

Se sabe, que NF- κ B es activado por un amplio rango de estímulos celulares que incrementan la actividad de las cinasas de I κ B (IKK) [15], que son un complejo de señalización de múltiples subunidades (señalosoma) capaz de unirse a I κ B y regular su señalización río abajo, a través de la fosforilación de éstas. El clásico señalosoma de IKK está compuesto por dos subunidades catalíticas, IKK- α (81 kDa) e IKK- β (90 kDa), y una subunidad regulatoria, IKK- γ (45 kDa), también conocida como regulador esencial de NF- κ B (NEMO) [16]. La fosforilación de I κ B da por resultado su ubiquitinación y degradación proteosomal, permitiendo la translocación nuclear de los complejos NF- κ B. En el núcleo, se unen a secuencias blanco en el DNA como promotores de genes, los cuales conducen a la activación transcripcional (vía clásica o canónica) [17]. NF- κ B también puede ser regulada por modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación y acetilación, que afectan la competencia transcripcional de las subunidades o su proporción de exportación nuclear [18, 19].

1.3 Bcl-3.

El gen *bcl-3* fue identificado por primera vez en pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) en los cuales se encuentra altamente expresado, sugiriendo que es un proto oncogen que puede contribuir al desarrollo de leucemias. El gen de *bcl-3* se encuentra en el cromosoma 19 y en estos pacientes con CLL, existe una translocación de este gen, la cual produce su sobreexpresión [20,21].

La proteína Bcl-3 es un miembro de la familia de los inhibidores de los factores de transcripción NF- κ B (I- κ B), pero a diferencia de los otros miembros, Bcl-3 tiene una localización nuclear y contiene un dominio de transactivación, y está involucrado directamente con la actividad de inhibición de NF- κ B [22]. La proteína Bcl-3, está involucrada en la vía no canónica de NF- κ B, ya que tiene una función de activador de NF- κ B de forma directa al unirse al complejo p50-p52 y activar la transcripción de genes específicos [23]. Además se ha reportado que puede modular su actividad inhibiendo específicamente su unión al DNA de los homodímeros p50 *in vitro* facilitando la transactivación mediada por p50-p65 [24].

El proto-oncogen Bcl-3 tiene diferentes papeles en el control del ciclo celular [20,25, 26], apoptosis [27], y recientemente se ha reportado que está relacionado con la reparación de DNA [28,29]. Bcl-3 puede promover la transcripción de la Ciclina D1, un regulador del ciclo celular y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [25]. Recientemente, se ha demostrado que la proteína ortóloga de Bcl-3 de *Caenorhabditis elegans* que interactúa con la proteína MRT2, la cual participa en el checkpoint del ciclo celular, podría tener un papel en la maquinaria de respuesta al daño al DNA celular [28,29]. Además, se ha reportado que la sobreexpresión

constitutiva de Bcl-3 suprime la activación de p53 a través de la expresión inducida de Hdm2 por el daño al DNA y Bcl-3; y la represión de la inducción de Bcl-3 conduce a un decremento en la expresión de Hdm2 y por ende la inducción de p53 [27]. Por último, Bcl-3 puede participar directamente en el proceso de tumorigénesis como un nuevo coactivador del factor de transcripción mitogénico AP-1 *in vivo* [30].

1.4 Radiación Ultravioleta (UV)

La UV es un tipo de energía indispensable para la vida y es una parte integral de la luz solar que llega a la superficie de la Tierra, sin embargo, aunque se sabe que la excesiva exposición a esta radiación puede tener repercusiones desfavorables en los seres vivos. La radiación UV tiene una variedad de efectos fisiológicos y bioquímicos en organismos, incluyendo la transformación maligna de las células [31], supresión inmune [32], envejecimiento celular [33], así como la inducción de reparación al DNA y apoptosis [34]. Existen evidencias epidemiológicas que indican que la irradiación UV es el principal medio cancerígeno responsable del desarrollo de cáncer en la piel. La inducción de la apoptosis después de la exposición radiación UV es a través de un mecanismo protector que da por resultado la eliminación de células potencialmente cancerosas con DNA mutado [35].

La radiación o luz UV está dividida en tres tipos: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (190-280 nm); y debido a la variación de los cromóforos, difieren en los procesos biológicos desencadenados [36]. El daño al DNA ha sido

considerado como el principal mediador de la transducción de señales inducida por UV en las células, principalmente debido a que el DNA genómico representa el cromóforo celular con la máxima absorción en la región UV (200-290 nm), siendo el blanco directo para las radiaciones UVB y UVC. Además, la radiación UV induce modificaciones directas e indirectas al DNA de una manera dependiente de longitud de onda; por ejemplo, mientras la UVA induce daño mediante el estrés oxidativo; la UVB y UVC son directamente absorbidas por el DNA e inducen la formación de fotoproductos [37, 38]. Estas lesiones inducen la activación de p53 y mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos [39-42].

La radiación UV produce la regulación de diversas vías de transducción de señales y, como la activación de las vías de MAPK, NF- κ B y p38; con la subsiguiente alteración de diversos eventos celulares como arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis [43, 44].

1.4.1 UVB.

La irradiación UVB activa las dos vías apoptóticas. Por un lado, induce la vía extrínseca al activar los receptores de muerte de la superficie celular, como Fas [45-47], TNFR1 [48,49], el DISC y la caspasa -8 [45,48]. La vía intrínseca se activa por señales que llegan a la mitocondria con la subsiguiente liberación de factores pro-apoptóticos como citocromo c, y la formación y activación del apoptosoma [50,51]; que es el principal determinante en la apoptosis inducida por UVB en queratinocitos [52,53].

La apoptosis inducida por UVB es inhibida por sobreexpresión de Bcl-2 y survivina [54,55]. Asimismo, se sabe que la liberación sostenida de Smac/DIABLO de la mitocondria al citosol río arriba induce la activación de caspasas que tienen un papel determinante en la apoptosis inducida por altas dosis de la irradiación UVB [56,57].

Se ha reportado que durante la inducción de apoptosis por UV el factor nuclear de transcripción NF- κ B se activa [58]. El mecanismo de acción NF- κ B en el proceso apoptótico inducido por UV, al parecer no es la vía canónica, ya que la inhibición de ésta no estimula a las células a apoptosis [59].

II. ANTECEDENTES.

El proto-oncogen Bcl-3 participa en la regulación del ciclo celular [25], así como en la proliferación celular [20, 22, 26,], apoptosis [27] y recientemente se ha reportado que está relacionado con la reparación de DNA [28,29]. Sin embargo, el papel que desempeña Bcl-3 en la apoptosis inducida por UVB no está bien establecido.

La apoptosis mediada por UVB es un proceso altamente complejo, en el cual participan una variedad de vías de señalización. Por estas razones, es importante conocer los mecanismos moleculares que desencadena el proto-oncoge Bcl-3 en células humanas. Apoyándonos en la habilidad de NF- κ B para regular las vías de la muerte celular [23, 28, 60], nos interesamos en conocer el papel de Bcl-3, (la vía no canónica de NF- κ B), en la sensibilización de células a apoptosis.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el papel de Bcl-3 en la apoptosis inducida por UVB y analizar su posible mecanismo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar la apoptosis inducida por UVB en la línea celular HeLa deficiente en Bcl3- (HeLa Bcl3-) y HeLa wild type, solo vector (HeLa Wt).
2. Analizar la expresión de proteínas de la vía intrínseca y extrínseca durante la apoptosis inducida por UVB en las líneas de células HeLa Bcl3- y Wt.
3. Analizar la expresión de proteínas involucradas en ciclo celular y reparación durante la apoptosis inducida por UVB en las líneas HeLa Bcl3- y Wt.

IV. HIPÓTESIS.

La vía no canónica de NF- κ B interviene en el proceso apoptótico inducido por UVB.

V. METODOLOGIA

Cultivo Celular y Lipotransfección. Células HeLa (cáncer cérvico-uterino, ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con 8% de suero fetal bovino (Gibco) a 37 °C con 5% de CO₂. Se transfectaron con el RNAi de Bcl-3 ó Luciferasa (vector pSIREN, Invitrogen), por lipotransfección (Lipofectamina 2000, Sigma). Las clonas se seleccionaron durante 6 días con 1 µg/ml de Puromicina (Sigma). Los niveles de expresión se determinaron por RT-PCR y Western Blot.

Ensayo de Viabilidad En placas de 48 pozos (Nunc) se colocaron 5x10⁴ células HeLa Bcl-3- y Wt en monocapa con 250µl de medio DMEM suplementado. Las células se expusieron a UVB usando un Transiluminador UVP (Upland, CA 91786, Modelo M-20) el cual emite su energía dentro del rango de la UVB 290-320 nm, con un pico de emisión de 302 nm. La dosis de irradiación fue 200 mJ/cm² a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 45 y 60 segundos) y posteriormente se incubaron durante 24 horas, a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, las células se tiñeron con cristal violeta (0.1%) y la absorbancia se determinó a 570 nm.

Ensayo de Bromuro de Etidio. En laminillas dentro de placas estériles de 15 mm² (Nunc) se colocaron 5x10⁴ células HeLa Bcl-3- y HeLa Wt en monocapa con 1 ml de medio DMEM suplementado, se expusieron las células a UVB (200 mJ/cm²) durante 1 minuto y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después se desechó el medio y se colocó etanol frío al 70% y se incubó durante 10 minutos a -

20°C. Se desechó el etanol y se incubó con 1 ml de PBS 1x y 5 µl de RNAsa a 55°C durante 1 hora. Posteriormente se le agregó 10 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml, Sigma) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados con PBS 1x (Gibco). Por último se montaron las laminillas en un portaobjetos y las células fueron observadas al microscopio.

Extracción de RNA. Los niveles de expresión de Bcl-3 de las clonas fueron verificados por RT-PCR. En placas de 150 mm² (Nunc) se cultivaron 8x10⁶ células con 7 ml de DMEM suplementado y se les extrajo el RNAm. Las células se despegaron con un gendarme estéril (Gibco) en 1 ml de DMEM y se colocaron en un tubo estéril (Eppendorf) de 1.5 ml, se centrifugaron a 2000 rpm por 20 segundos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 1 ml de Trizol frío (Gibco), posteriormente se adicionaron 200 µl de Cloroformo (Sigma) y se incubaron las células durante 10 minutos a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se extrajo la fase acuosa del centrifugado se agrega 1 volumen de Isopropanol (Sigma) frío y se incubó 10 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, la pastilla se lavó con 500 µl de Etanol (Sigma) al 70% frío y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. La pastilla se dejó secar y se disolvió en 20 µl de TE (Sigma) estéril. El RNA se cuantificó y se corrió en un gel de agarosa para verificar su pureza e integridad.

RT-PCR. El cDNA fue generado utilizando el Kit de Reversa transcriptasa Superscript (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el PCR se

utilizaron oligonucleótidos específicos contra el gen *bcl-3* y GAPDH como control de carga. Los oligonucleótidos utilizados fueron en sentido gat ccg caa cct ggg gca gac acc gtt caa gag acg gtg tct gcc gta ggt tgt ttt tta, y antisentido aat tca cgc gta aaa aac ttc cta cgg cag aca ccg tct ctt gaa cgg tgt ctg ccg tag; y las condiciones del programa de PCR para la amplificación del gene *bcl-3* utilizado se encuentran en la Tabla 1.

PASOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95°C	10 minutos
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineamiento	58°C	30segundos
Extensión	72°C	1 minuto
Repeticiones	---	3 ciclos
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineamiento	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	1 minuto
Repeticiones	---	28 ciclos
Extensión Final	72°C	5 minutos
Temperatura Final	4°C	

Tabla 1. Condiciones para la amplificación del gene *bcl-3* por PCR.

Extracción de proteínas (RIPA). En placas de 150 mm² se cultivaron 8x10⁶ células con 7 ml de DMEM suplementado; se expusieron a irradiación UVB (200 mJ/cm²) durante 1 minuto, se incubaron por 24 horas a 37°C y como control se utilizaron células no expuestas a irradiación; a las cuales se les extrajeron las proteínas totales. Las células fueron lavadas con PBS 1x y colocadas en un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 segundos. Se decantó el sobrenadante y se disolvió la pastilla en 250 µl de amortiguador RIPA (1% de NP-

40, 50 mg de Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1mM de PMSF, 1mM de ortofosfato, 1mM de pirofosfato, 2mM de gliceralfosfato y 1mM de cocktail de inhibidores, adquiridos de Sigma). Se incubó durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se obtuvo la fase acuosa y las proteínas fueron cuantificadas.

Extracción de proteínas mitocondriales y citosólicas. En placas de 150 mm² se cultivaron 8×10^6 células HeLa Bcl3- y Wt con 7 ml de DMEM suplementado, se expusieron a irradiación UVB (200 mJ/cm²) durante 1 minuto y se incubaron a diferentes intervalos de tiempo a 37°C; y como control se utilizaron células no expuesta a la irradiación. A estas células se les extrajeron proteínas mitocondriales y citosólicas. Las células fueron lavadas con PBS 1x frío y colocadas en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 segundos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 350 µl de Buffer Lisis I (250mM Sacarosa, 70mM KCl, 137mM NaCl₂, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄ pH7.2, 200 µg/µl Digitonina, 100mM PMSF y los inhibidores de proteasas; Sigma). Se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante que es la fracción citosólica. La pastilla se lavó con 200 µl de PBS 1x frío y se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. La pastilla se disolvió con 700 µl de Buffer Lisis Mitocondrial (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl₂, 2mM EDTA, 2mM EGTA, .2% Tritón X-100, 0.6% NP-40 y los inhibidores de proteasas; proporcionados por Sigma). Se incubó durante 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante que es la fracción mitocondrial.

Extracción de proteínas nucleares y citosólicas (EMSA). En placas de 150 mm² se cultivaron 8x10⁶ células con 7 ml de DMEM suplementado, las cuales se expusieron a radiación UVB (200 mJ/cm²) durante 1 minuto y se incubaron a diferentes intervalos de tiempo a 37°C; y como control se utilizaron células no expuesta a irradiación. A estas células se les extrajeron proteínas nucleares y citosólicas. Las células fueron lavadas con PBS 1x frío, colocadas en un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 segundos. Se decantó el sobrenadante, la pastilla se disolvió en 300 µl de Buffer A (10 mM Hepes pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, agua y los inhibidores de proteasas; adquiridos en Sigma) y se incubó 15 minutos en hielo. Después se le agregaron 15 µl de NP40 (Sigma) al 10% e inmediatamente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Se obtuvo el sobrenadante que es la fracción citosólica. La pastilla se disolvió vigorosamente con 100 µl de Buffer C (25 mM Hepes pH 7.5, 40 mM NaCl, 1mM EDTA, 20% glicerol y agua; Sigma) y se incubó durante 30 minutos en hielo, agitando ocasionalmente. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Se obtuvo el sobrenadante que son las proteínas nucleares.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Para el análisis de proteínas se utilizaron geles de Acrilamida/Bis-acrilamida (Invitrogen) al 10, 12 y 15%, dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés. Las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteína; se cargaron 20 µg de proteína y se corrieron electroforéticamente.

Anticuerpos. Para los ensayos de Western Blot se utilizaron diferentes anticuerpos: Bcl-3 (sc-185, Santa Cruz), Caspasa-3 activa (9661, Cell Signaling),

Caspasa-8 (H-134, Santa Cruz) y Caspasa-9 activa (9501, Cell Signaling), FLIP (06-697, Upstate), Bcl-2 (124, DAKO), Bid (sc-6538, Santa Cruz), Ref-1 (sc-334, Santa Cruz), Smac/DIABLO (PC574, Calbiochem), Yin Yang (sc281, Santa Cruz), p53 (ASK07, ASOP32, ASK07, OP32, ASK07, Calbiochem), Survivina (sc10811, Santa Cruz), DNApk (sc1559, Santa Cruz), α -tubulina (064-4811, Amershan), α -Actina (sc1616, Santa Cruz), Nucleolina (C23, Santa Cruz), Anti-mitocondria (AB3598, Chemicon International) Anti-porina (pc548, Calbiochem). Anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra, Promega.

Western Blot y revelado por quimioluminiscencia. Después de la electroforesis de proteínas, el gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de PVDF-Immobilon (Millipore) y la transferencia se realizó en un sistema semi-seco con buffer de transferencia 1X (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1% y metanol 20%; proveídos por Sigma) durante 15 minutos. La membrana transferida se bloqueó con 0.05% de leche en TBS 1X / 0.1% Tween durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo primario. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó con TBS 1X/Tween durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (0.5:1500) durante 1 hora con agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con TBS 1X/Tween durante 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente. Por último, a la membrana se le agregó una solución de sustrato y luminol (Kodak) por 3 minutos y se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas Kodak.

VI. RESULTADOS

Primero se obtuvieron células HeLa con la expresión de Bcl-3 baja, para esto fueron transfectadas con un RNAi diseñado para obtener niveles proteicos bajos de Bcl-3. El diseño de los oligos y clonación en el vector pSIREN fueron realizados por el estudiante de doctorado Rubén Zamora. La figura 1, muestra los niveles proteicos y RNAm de Bcl-3 en células HeLa transfectadas con RNAi de Bcl-3 (HeLa Bcl3-) y en células HeLa Wt (control), las cuales se transfectaron con el vector pSIREN conteniendo un RNAi dirigido para el gene de luciferasa. Los experimentos revelaron que las células HeLa Bcl-3- expresan niveles bajos de RNAm y proteína comparando con las células HeLa Wt.

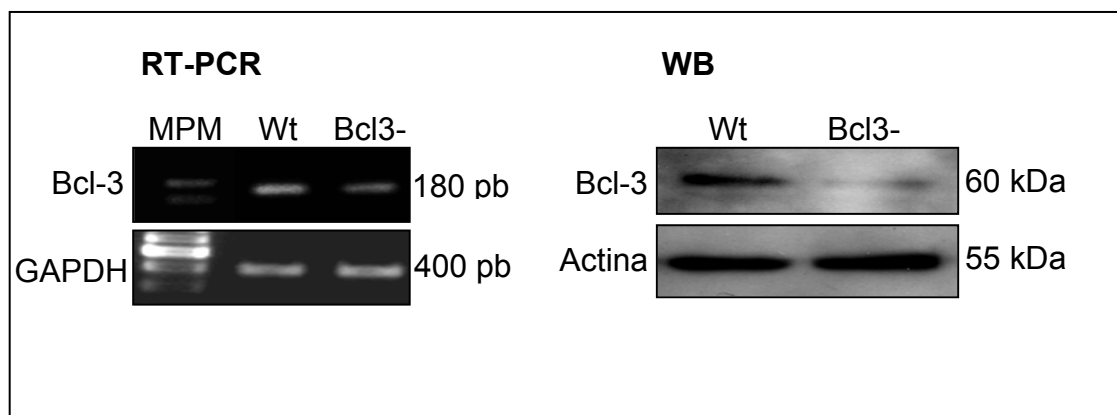


Figura 1. Niveles de RNAm y proteína de Bcl-3 en células HeLa Bcl3- y HeLa Wt.

Una vez obtenidas las células que expresaron niveles de Bcl-3 bajos, se procedió a determinar su sensibilidad a radiación UVB. Por lo tanto, las células HeLa Bcl3- y HeLa Wt fueron expuestas a radiación UVB (200 mJ/cm²) durante 1 minuto, e incubadas a 37°C durante 24 horas. La viabilidad celular fue medida con tinción de cristal violeta (Figura 2).

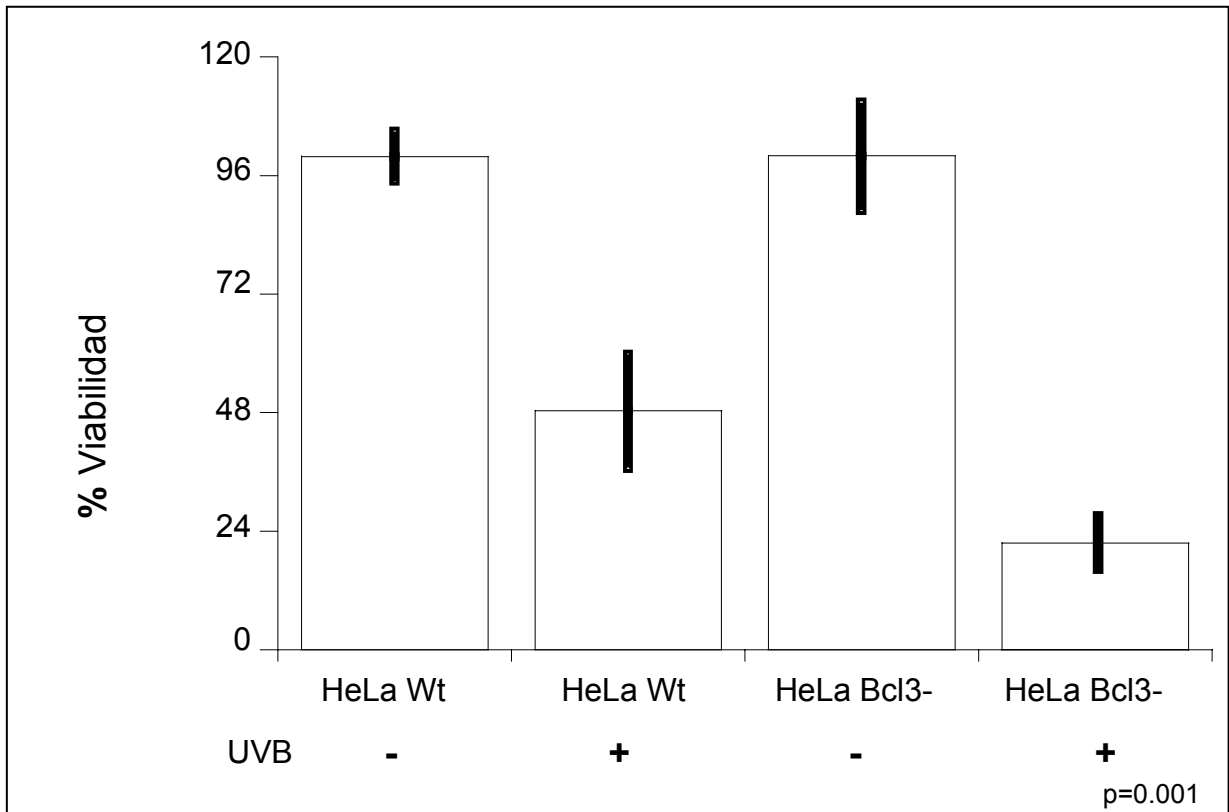


Figura 2. Viabilidad en células HeLa Bcl3- y HeLa Wt expuesta a UVB durante 1 minuto. La viabilidad fue medida con cristal violeta.

Al medirles la viabilidad después de 24 horas de incubación, se encontró que células HeLa que expresan poco Bcl-3 son significativamente más sensibles a la exposición con radiación UVB que las células HeLa Wt. Además las células con niveles bajos de Bcl-3 observados al microscopio mostraron una morfología característica de células apoptóticas y hay diferencias estadísticamente significativas.

Se procedió a exponer las células a varios tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 120 segundos) de radiación UVB (200 mJ/cm²), y la viabilidad fue cuantificada por cristal violeta (0.1%) a las 12, 24 y 36 horas (Figura 3).

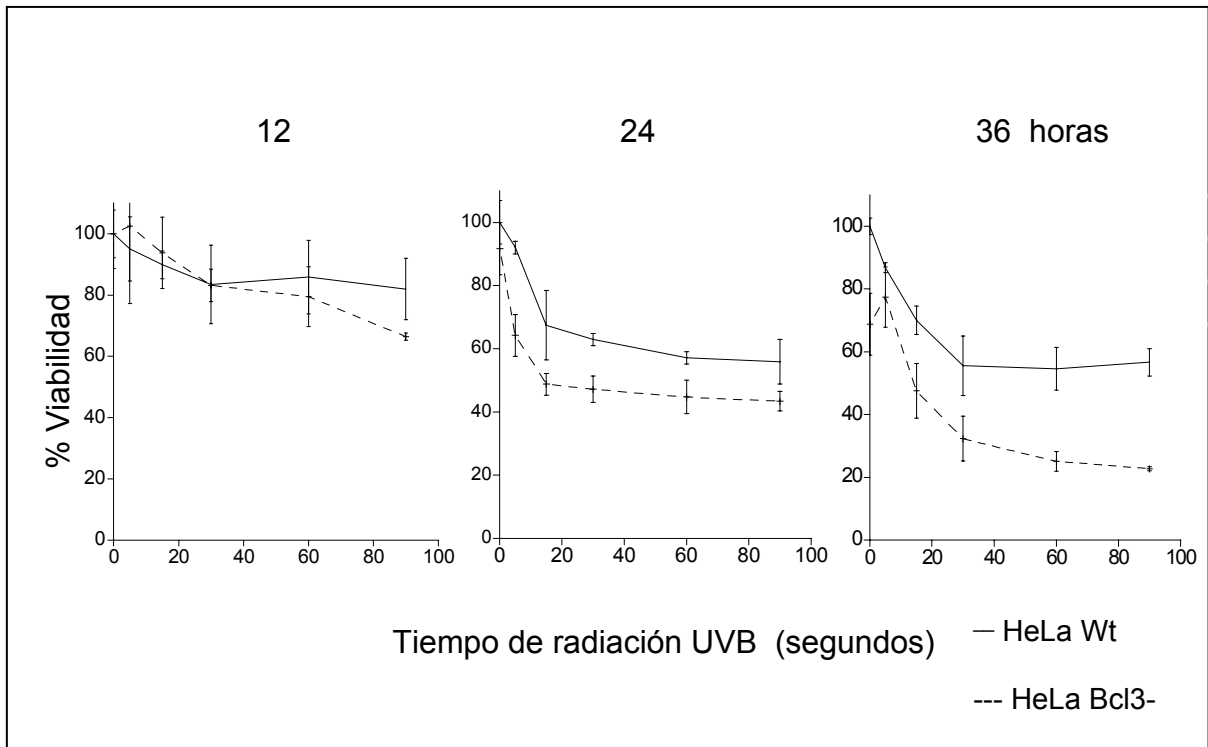


Figura 3. Viabilidad de células HeLa Bcl3- (línea punteada) y HeLa Wt (línea continua) de dosis de tiempo en radiadas con UVB durante varios segundos (0, 5, 15, 30, 60 y 90) y después de 12, 24 y 36 horas se determinó la viabilidad por cristal violeta.

Los resultados que se observan en la Figura 3, muestran que las células HeLa Bcl3- y HeLa Wt disminuyen escasamente su viabilidad al ser radiadas e incubadas 12 horas después, aunque las células HeLa Bcl3- muestran una pérdida mayor que las HeLa Wt, pero no se encontraron diferencias significativas a nivel estadístico. A las 24 hrs después de radiación, las células HeLa Bcl3- menor viabilidad desde la radiación con 15 segundos. Después de 36 horas de radiación se observa un clara diferencia entre las células HeLa Bcl3- y HeLa Wt, siendo las primera más sensibles a radiación UVB.

Para establecer si la pérdida de viabilidad observada después de la radiación con UVB era por apoptosis, se analizó la fragmentación de núcleos, con la técnica de

tinción nuclear con bromuro de etidio en las células HeLa Bcl3- y HeLa Wt expuestas a radiación UVB (Figura 4).

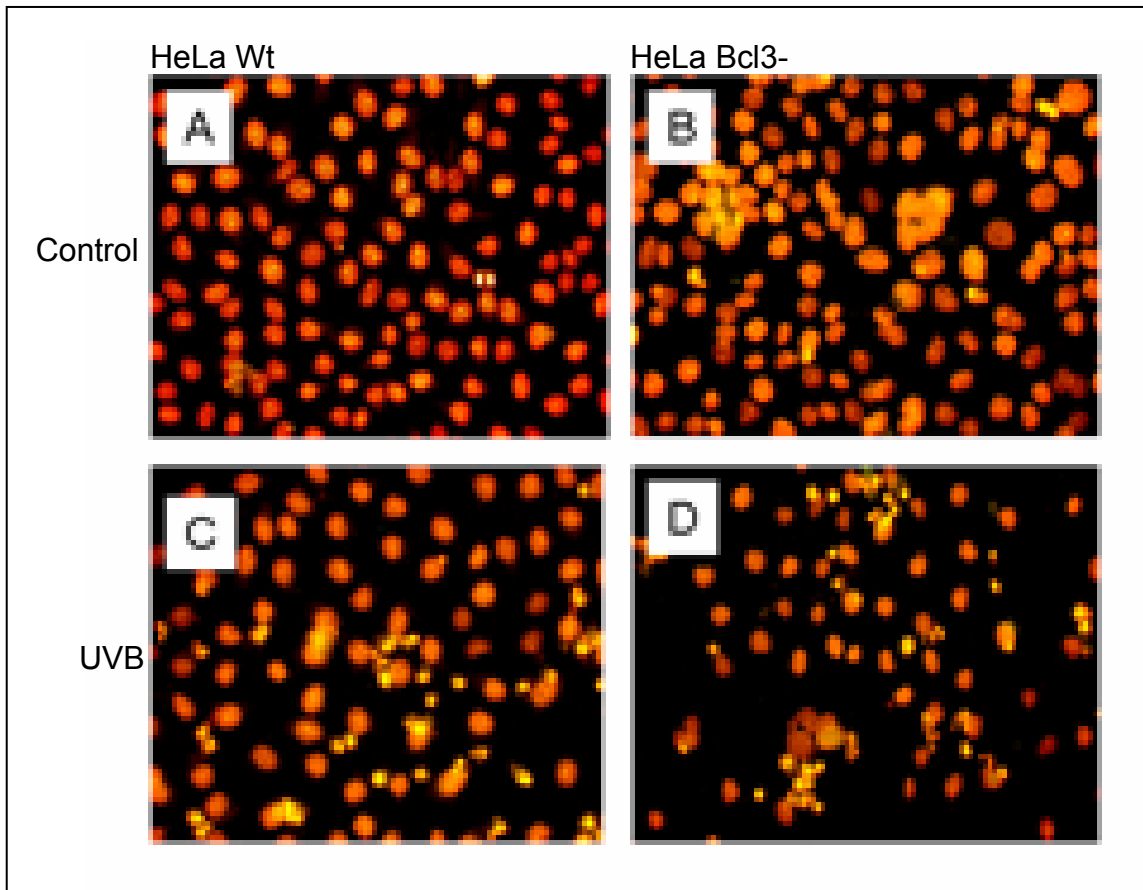


Figura 4. Fragmentación de núcleos después de la irradiación con UVB. La determinación se realizó por el ensayo de tinción de núcleos con bromuro de etidio. (A) Células HeLa Wt y (B) HeLa Bcl3- no irradiadas; (C) HeLa Wt y (D) HeLa Bcl3- fueron irradiadas con UVB ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$) durante 1 minuto y 24 horas después se realizó el ensayo de tinción de núcleos como se menciona en la metodología.

Como se muestra en la Figura 4, las células HeLa Bcl3- y HeLa Wt sin radiar muestran núcleos redondos. En las células HeLa Bcl3-, se observó una mayor cantidad de células multinucleadas y en general fueron de mayor tamaño. Ambas clonas celulares al ser expuestas a radiación UVB mostraron núcleos apoptóticos, pequeños, condensados y algunos fragmentados. En los cultivos de células HeLa

Bcl-3- se encontró mayor número de núcleos apoptóticos y adheridos a la superficie comparados con los cultivos de células HeLa Wt.

La morfología característica de la apoptosis se pudo observar bajo el microscopio después de que las células Hela Bcl-3- y HeLa Wt fueron expuestas a irradiación UVB durante 1 minuto e incubadas durante 24 horas (Figura 5).

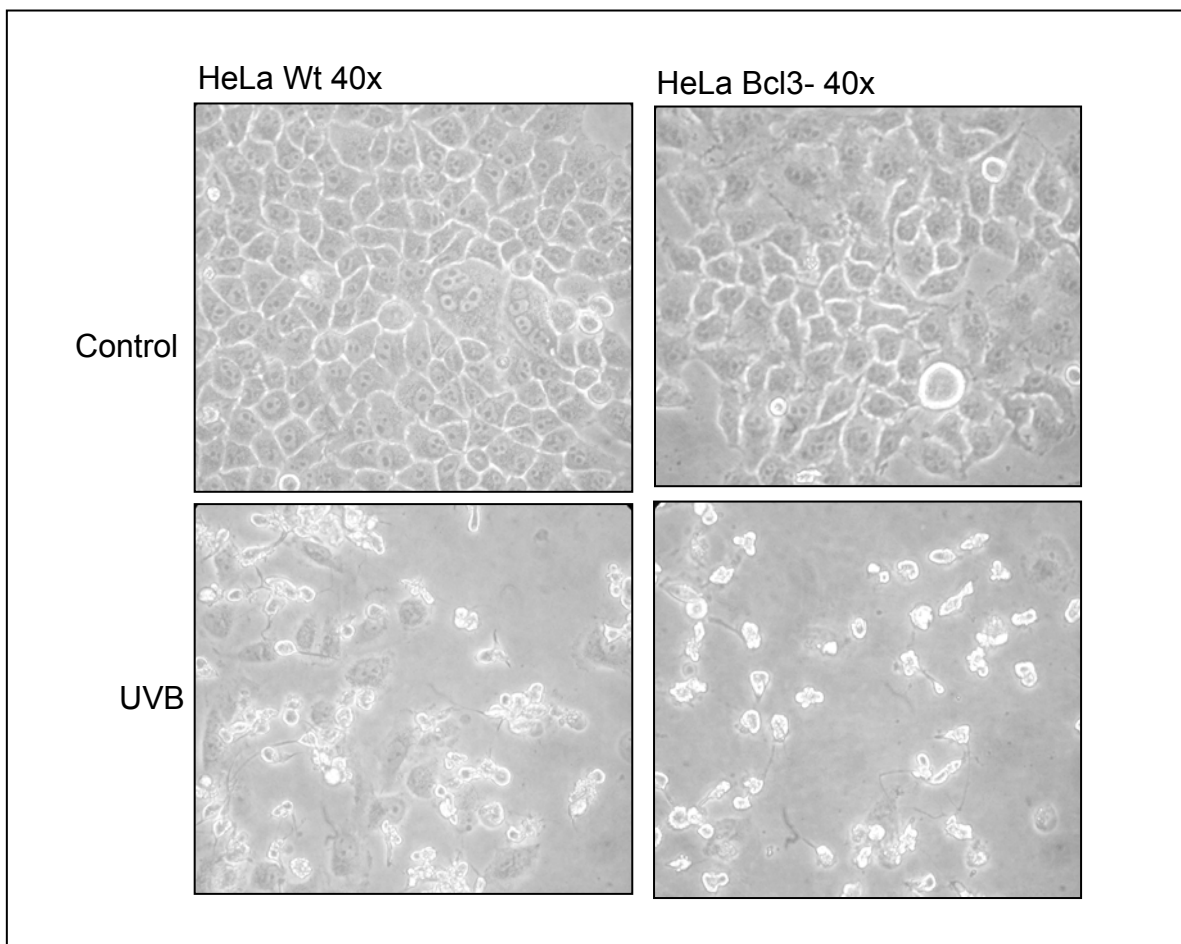


Figura 5. Morfología apoptótica de células HeLa Bcl3- y HeLa Wt, después 24 horas de ser expuestas a radiación UVB (200mJ/cm²) por 1 minuto.

Bajo estas condiciones, se puede apreciar la típica morfología apoptótica como la contracción de las células, invaginaciones de la membrana plasmática y rompimiento de las células en pequeños cuerpos apoptóticos. Un fenómeno importante que se puede observar es que las células expuestas a UVB pierden su capacidad de contacto con las células vecinas.

Para determinar si la mayor sensibilidad de las células HeLa Bcl-3- se debe a cambios en las vías apoptóticas, se obtuvieron proteínas de células expuestas a UVB y la activación de caspasa -8, -9 y -3 fue analizada por Western Blot usando anticuerpos específicos para cada caspasa (Figura 6).

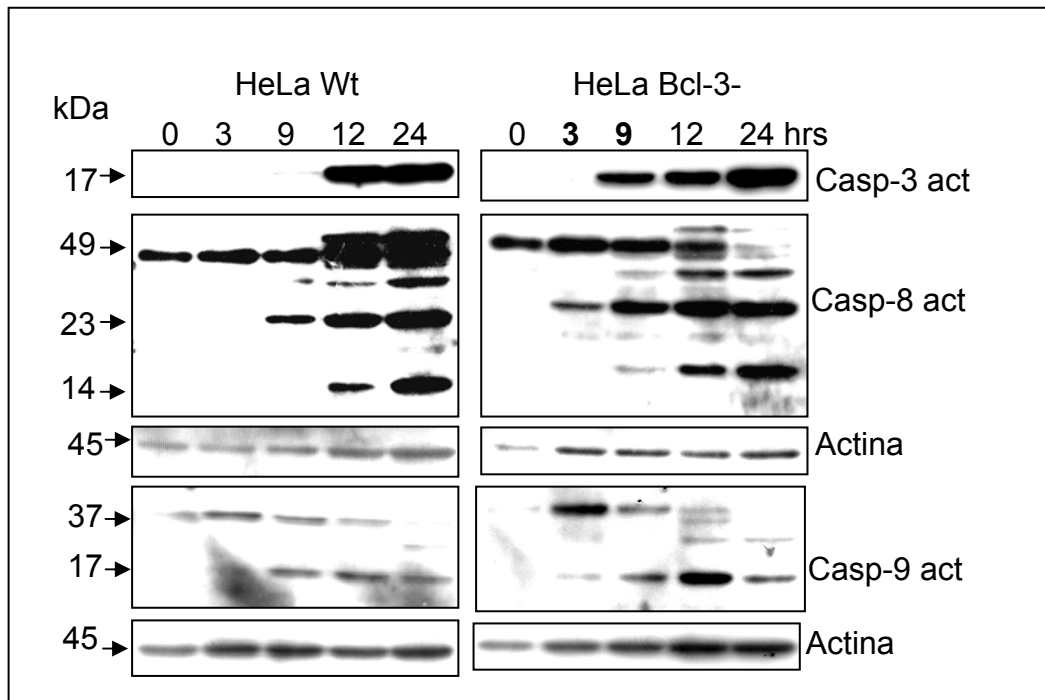


Figura 6. Activación de las Caspasa -3, -8 y -9 en células HeLa Bcl-3- y HeLa Wt expuestas a UVB durante un curso temporal (0, 3, 9, 12 y 24 horas). Las células fueron radiadas con UVB por 1 minuto. El Western Blot fue realizado con extractos citosólicos y se utilizaron anticuerpos específicos contra Caspasa -3, -8 y -9 y actina como control de carga.

Como se muestra en la Figura 6, se detectó la activación de la caspasa -3 la cual fue claramente detectada a tiempos más tempranos (9 horas) en las células HeLa Bcl-3-, en contraste con las células control que se detectó a las 12 horas.

Por otro lado, cuando las células HeLa Bcl-3- fueron radiadas con UVB, la activación de la procaspasa -8 fue detectada a las 3 horas, en contraste con la caspasa -9 que fue detectada 6 horas después de la irradiación. Mientras que en las células HeLa Wt la activación de la caspasa -8 y -9 se observó en ambas a las 9 horas después de la irradiación. Estos resultados sugieren que la mayor susceptibilidad a apoptosis por UVB se debe a una activación más temprana de la vía extrínseca.

Para determinar si FLIP (proteína inhibidora de FLICE), una proteína con estructura homóloga a la Caspasa -8 y que puede inhibir al bloquear su sitio de unión y activación, estaba involucrada en esta activación diferencial de la vía extrínseca en las dos clonas de células HeLa se examinaron por Western Blot los niveles de FLIP en células HeLa Bcl-3- después de la irradiación con UVB (Figura 7).

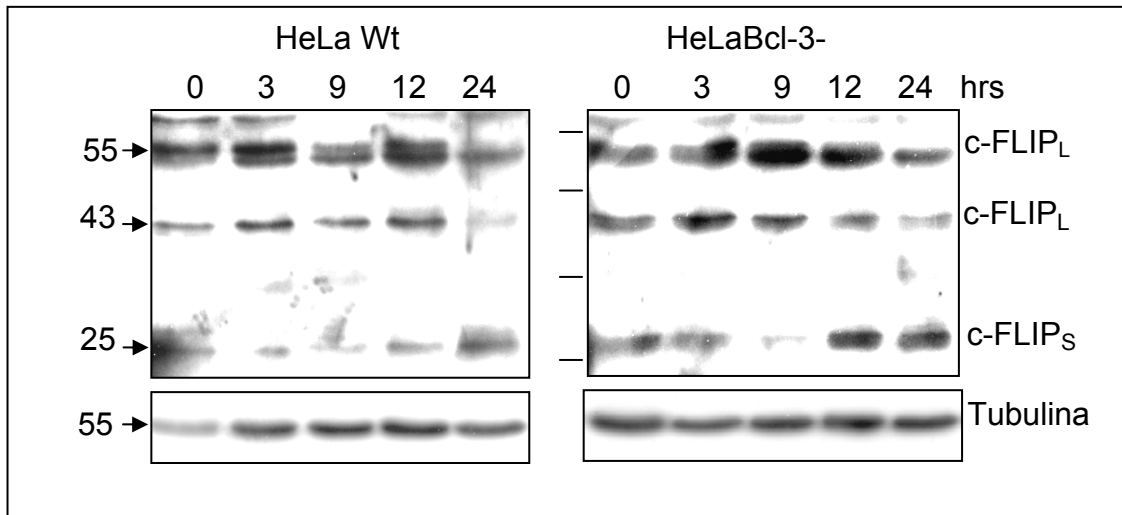


Figura 7. Niveles de FLIP en células HeLa Bcl-3- y HeLa Wt radiadas con UVB. El Western Blot se realizó con extractos citosólicos después de exponer las células a UVB durante 1 minuto e incubarlas a diferentes tiempos; y se utilizaron anticuerpos específicos contra FLIP y tubulina como control de carga.

Se pudieron detectar ambas isoformas de FLIP, la isoforma larga (c-FLIP_L de 55 kDa y su forma procesada 43 kDa) y c-FLIP corta (c-FLIP_S de 25 kDa). Los niveles de la forma c-FLIP_L disminuyeron en etapas tardías de la apoptosis. Los niveles de la isoforma c-FLIP_S disminuyeron en etapas tempranas de la apoptosis y aumentaron en etapas tardías. En las células HeLa Bcl-3- este aumento de la isoforma c-FLIP_S fue ligeramente mayor.

Para determinar si la caspasa -8 es activada directamente o por retroalimentación de la caspasa -9 o -3, se analizaron los niveles de las proteínas que actúan en la vía mitocondrial. Se analizaron los niveles de Bid, un miembro de la familia de Bcl-2 que puede ser activado a través de la caspasa -8, originando proteolíticamente un rompimiento a Bid y dando lugar a la forma truncada (tBid), el cual se inserta en

la mitocondria liberan al citocromo c; y activación de la vía intrínseca. En la figura 8, se puede observar que existe un aumento en los niveles de Bid mitocondrial que se aprecian mejor en las células Bcl-3-.

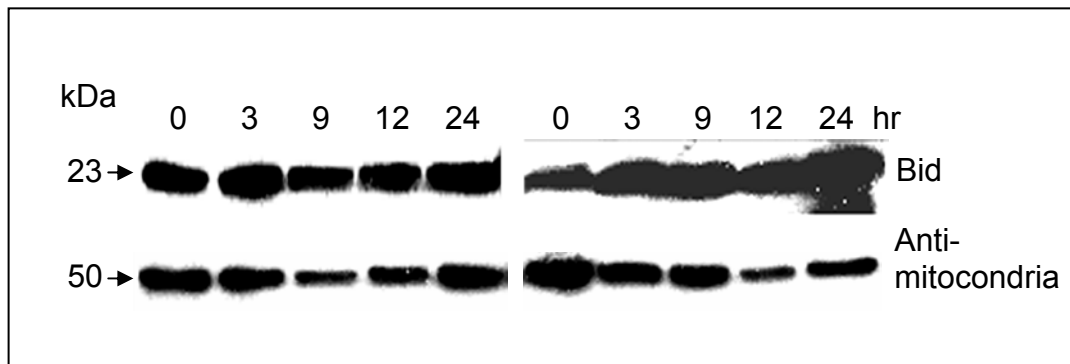


Figura 8. Niveles de Bid en células HeLa Bcl-3- y HeLa Wt expuestas a UVB durante 1 minuto e incubadas a diferentes tiempos. El Western Blot se realizó con extractos mitocondriales y se utilizaron anticuerpos específicos contra Bid y anti-mitocondria como control de carga.

Se examinaron los niveles de la proteína Bcl-2, la cual tiene una función anti-apoptótica al prevenir la liberación del citocromo C y la subsiguiente activación de la caspasa -9. Las células HeLa con niveles bajos de Bcl-3 presentaron niveles más altos de la proteína Bcl-2 mitocondrial comparada con células Wt, si bien en los dos sistemas se aprecia una disminución de los niveles de esta proteína a las 12 y 24 horas.

También se analizaron los niveles Smac/DIABLO mitocondrial y se encontró que en ambas líneas celulares disminuyen los niveles de esta proteína antiapoptótica a nivel mitocondrial como ocurre en diversos sistemas apoptóticos. Es interesante mencionar que el nivel basal en la mitocondria es mayor en las células HeLa Bcl-3- (Figura 9).

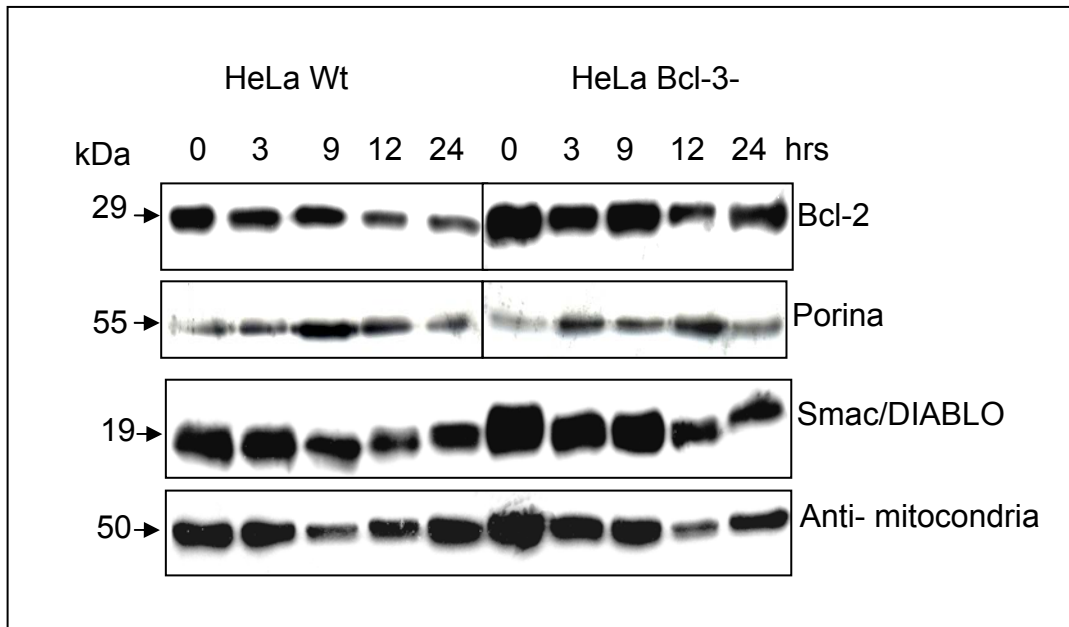


Figura 9. Liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria y niveles de Bcl-2 en células HeLa Bcl-3 - y HeLa-Wt expuestas a UVB. El Western Blot se realizó con extractos mitocondriales y se utilizaron anticuerpos específicos contra Bcl-2, Smac/DIABLO y anti-mitocondria como control de carga.

El siguiente paso fue el realizar el análisis de proteínas nucleares relacionadas con reparación al DNA, debido a que la UVB tiene como molécula blanco el DNA. Se sabe, que las células HeLa contienen niveles muy bajos de p53, si bien en las células Bcl-3- desaparecen totalmente durante la apoptosis inducida por UVB en las células Wt aumentaron los niveles en tiempos tardíos de la apoptosis 24 horas después de radiación, este aumento también se aprecia a las 24 horas en células Bcl-3- pero en mucho menor extensión (Figura 10).

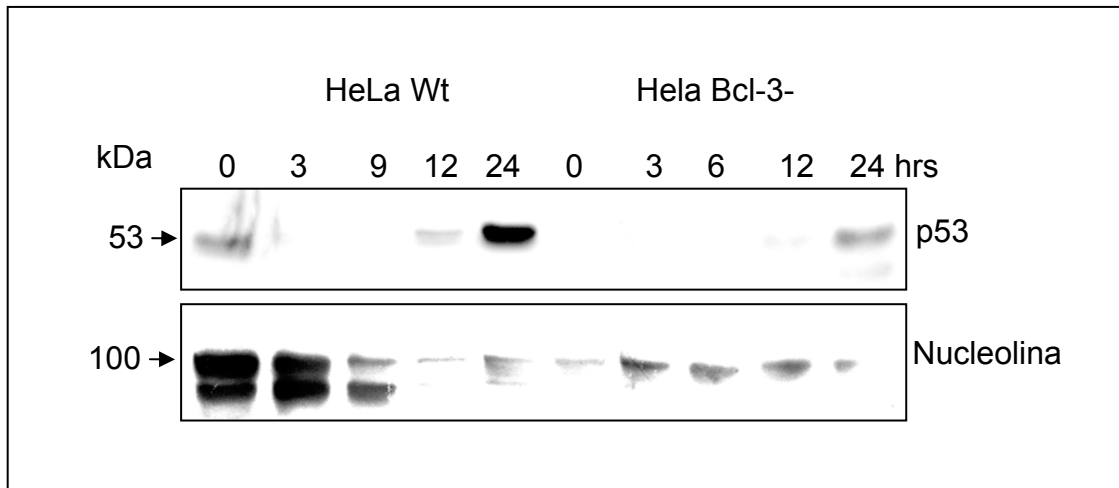


Figura 10. La baja expresión de Bcl-3 suprime la expresión de p53. Se analizaron los niveles de p53, en células HeLa Bcl-3- y HeLa Wt expuestas a UVB. El Western Blot se realizó con extractos nucleares y se utilizaron anticuerpos específicos contra p53 y nucleolina como control de carga.

Posteriormente se analizaron los niveles de un regulador clave de p53, la proteína Yin Yang (YY1). En la figura 11, se puede observar que en células HeLa Bcl-3- disminuyeron los niveles de YY1 comparado con las células control, lo que apunta a que Bcl-3 está regulando YY1 y este a su vez regula negativamente a p53.

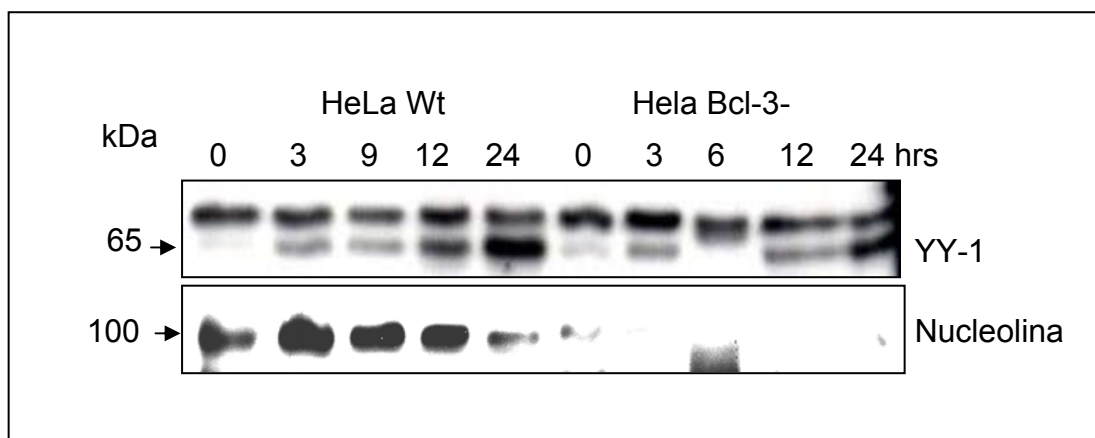


Figura 11. Expresión de YY1 en la apoptosis inducida por UVB en células HeLa con bajos niveles de Bcl-3. El Western Blot fue hecho con extractos nucleares de células HeLa Bcl-3 y Wt (control) radiadas con UVB durante 1 minuto.

Por otro lado, se analizaron los niveles de Ref-1, otro un regulador clave de p53 y a través de ello tiene un papel en el arresto del ciclo celular, la apoptosis y reparación al DNA. Como se muestra en la Figura 12, los niveles de Ref-1 nucleares se mantienen constantes durante la apoptosis inducida por UVB en células HeLa Wt; si bien en los núcleos de células Bcl-3- encontramos niveles basales muy bajos comparados con su contraparte HeLa Wt. Durante el curso de la apoptosis estos niveles bajos no se recuperan hasta tiempos tardíos de la apoptosis (24 horas) en los cuales aumenta en las células HeLa Bcl-3-.

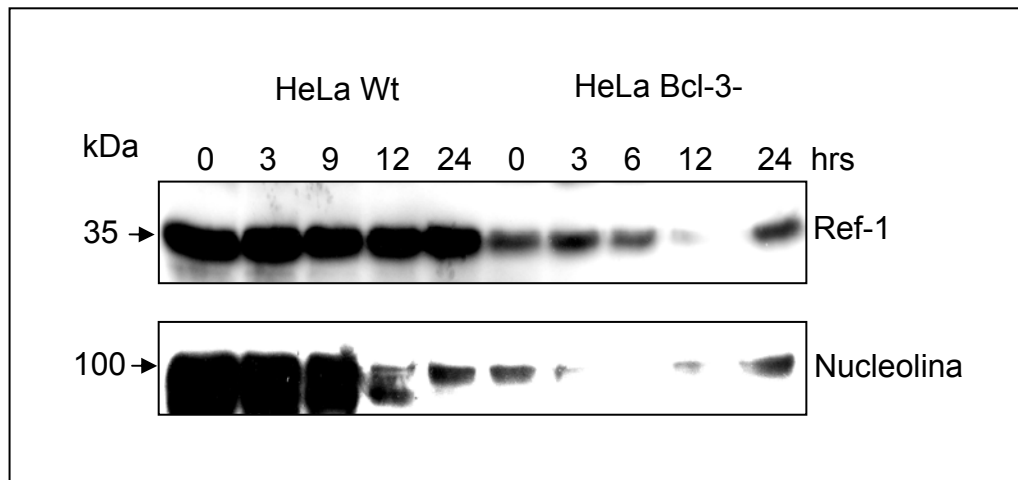


Figura 12. Niveles de Ref-1 en células HeLa Bcl-3 - y HeLa Wt expuestas a UVB durante 1 minuto.

Después de los resultados obtenidos, se procedió a investigar el papel de DNA-PK ya que se sabe que juega un papel importante en la reparación DNA y regulador de p53 en respuesta a la radiación, participando así en el daño al DNA y la apoptosis. Estos resultados muestran que los niveles de DNA-PK se encuentran totalmente inhibidos en células HeLa Bcl-3-, mientras que en las células control los niveles de DNA-PK sólo fueron observados a nivel basal (Figura 13).

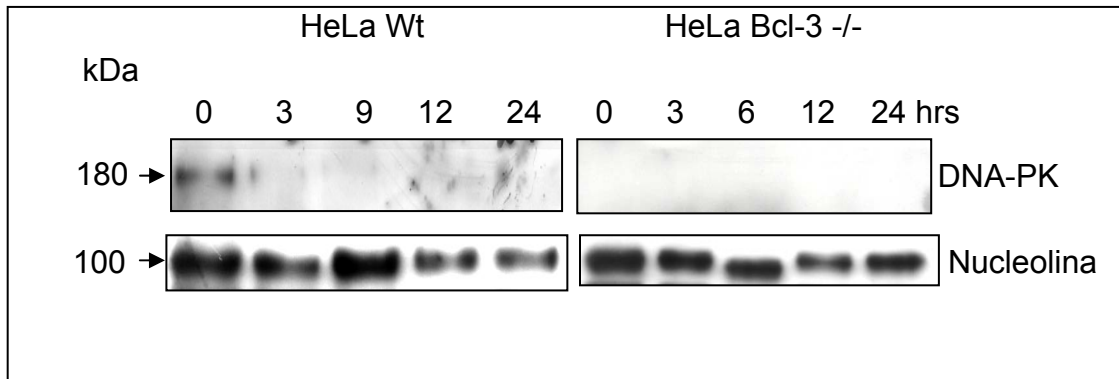


Figura 13. Niveles de DNA-PK en células HeLa Bcl-3 - y HeLa Wt expuestas a UVB.

Por otro lado, se investigó el papel de la Survivina, proteína que pertenece a la familia de las IAPs que tiene una función anti-apoptótica inhibiendo directamente a la Caspasa -3 y -7; y otra función que se le atribuye es la de reguladora del huso mitótico, el cual es regulado negativamente por p53 (Figura 14).

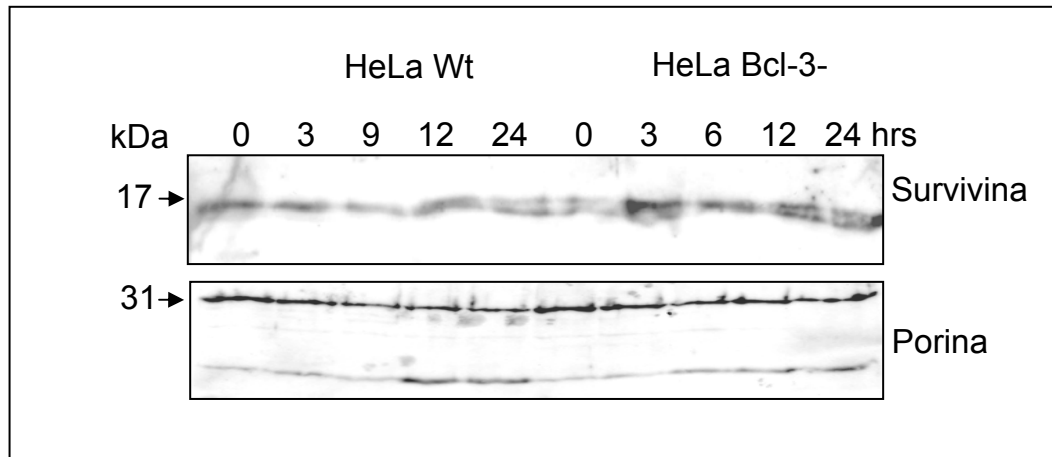


Figura 14. Niveles de expresión de Survivina en la apoptosis inducida por UVB en células HeLa con bajos niveles de Bcl-3. El Western Blot se realizó con extractos nucleares y se utilizaron anticuerpos específicos contra Survivina y nucleolina como control de carga.

No se encontraron cambios significativos en los niveles de Survivina tipo en células HeLa Bcl-3- comparado con HeLa control durante la apoptosis. Es interesante destacar que en las etapas finales de la apoptosis, a las 12 y 24 horas se expresa otra isoforma de survivina. En las células Bcl-3 esta isoforma se observa durante todo el curso temporal incluso en células sin tratamiento. Sería interesante determinar que isoforma de survivina es, por medio de PCR o Western blot con anticuerpos específicos para las diferentes isoformas. Por otro lado, es importante mencionar que nos tropezamos con inconvenientes con los anticuerpos de control de carga para las proteínas nucleares, parece que se modifican en las células HeLa con bajos niveles de Bcl-3 y durante la apoptosis. Se procedió a utilizar el anticuerpo contra porina (VDAC) que es una proteína mitocondrial, pero en la literatura se reencontró que suele colocalizarse en el núcleo durante la apoptosis [84].

VII. DISCUSION

El proto-oncogen Bcl-3 es una proteína reguladora del factor nuclear Kappa B (NF- κ B), y está involucrado en el control del ciclo celular [25], proliferación celular [20, 22, 26], apoptosis [27] y recientemente se ha reportado que está relacionado con la reparación de DNA [28,29]. Sin embargo, el papel de Bcl-3 en la apoptosis inducida por UVB no está establecido.

La radiación UVB es el factor de riesgo más importante para el cáncer de piel debido a su habilidad para inducir daño al DNA y mutaciones [34]. La apoptosis es considerada un mecanismo de protección ya que elimina células que contengan DNA lesionado y potencialmente malignas. Por lo tanto, es importante el estudio y análisis de las moléculas y vías de transducción de la señal que modulen la apoptosis inducida por UVB.

En este trabajo, se enfocó en el análisis de la participación de Bcl-3 en la apoptosis inducida por UVB en células HeLa. Primero se obtuvieron células HeLa que expresaran niveles de Bcl-3 bajos (HeLa Bcl-3-), las cuales fueron transfectadas con un RNAi dirigido contra esta proteína. Como control se utilizaron células con un RNAi contra el gene de luciferasa (HeLa Wt). La disminución de la expresión de Bcl-3 se confirmó por RT-PCR y Western Blot (Figura 1).

Para determinar si la inducción de bajos niveles de Bcl-3 en células HeLa, afecta su sensibilidad a la apoptosis se expusieron radiación UVB durante 1 minuto y se midió su viabilidad con el ensayo de cristal violeta. Las células HeLa Bcl-3- fueron

40% más sensibles a la apoptosis inducida por UVB que las células control (Figura 2). Al radiar las células con diferentes dosis de UVB durante un curso temporal se confirmó que las células HeLa Bcl-3- son más sensibles, efecto que es más notorio a las 24 y 36 horas después de la UVB comparado con las células HeLa Wt (Figura 3).

Para establecer si la muerte inducida por irradiación UVB era por apoptosis, se analizó la fragmentación de núcleos; y se encontró que efectivamente existe una fragmentación de núcleos, lo cual sugiere que la muerte observada se lleva a cabo por apoptosis (Figura 4). Asimismo, bajo el microscopio se observó la morfología característica de la apoptosis con una notoria disminución en el volumen celular, presencia de cuerpos apoptóticos y un aumento de densidad celular (Figura 5).

En 1998, se reportó que la radiación UVB induce apoptosis vía intrínseca y extrínseca [46,50]. Para determinar si alguna de las dos vías o ambas son alteradas en las células HeLa Bcl-3- expuestas a radiación UVB se realizó un análisis de los niveles proteicos de proteínas clave de cada vía apoptótica (Figura 6).

En ambas células se detectó la caspasa 3 activa, en las células HeLa Wt la caspasa es cortada a las 12 hrs, mientras que en las células HeLa Bcl-3- se detectó la caspasa 3 activa desde las 9 horas; lo cual confirma que estas últimas células sufren apoptosis a tiempos más tempranos. Cuando se analizaron los niveles de la caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis, la caspasa 8, también se encontró activa en tiempos más tempranos (3 hrs) en las células HeLa

con niveles bajos de Bcl-3 comparadas con las células HeLa Wt (9 hrs). Esto indica que la mayor muerte por apoptosis de las células Bcl-3-, se debe por lo menos en parte por la activación más temprana de la vía extrínseca. Cuando se analizó el inicio de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis por la activación de la caspasa 9 también se encontró una más rápida activación en las células con niveles bajos de Bcl-3. Esta caspasa se activó a las 3 hrs posradiación en células HeLa Bcl-3- y a las 9 hrs en células HeLa Wt. Sería interesante analizar la activación de las dos caspasas en intervalos de tiempo mas pequeños, y así en este lapso determinar que vía se activa primero.

Cuando se analizó la proteína reguladora de la caspasa 8 denominada FLIP, encontró que en las células existen dos isoformas de la proteína FLIP L y S, en la isoforma FLIP_L se encontró una pequeña disminución en etapas tardías de la apoptosis en ambas células. La isoforma FLIP_S aumentó en las etapas tardías de la apoptosis y este aumento es mayor en las células HeLa Bcl-3- (Figura 7). Las dos isoformas FLIP han sido consideradas como inhibidoras de la caspasa 8, si bien se ha reportado que cuando se sobreexpresan tienen un efecto contrario, es decir inducen apoptosis [61, 62]; al parecer en este sistema y sobretodo con la isoforma S aumentan sus niveles en etapas tardías. Lo que lleva a sugerir, que la activación de la caspasa 8 más temprana en las células HeLa Bcl-3- no se debe a una disminución de la proteína FLIP. Sería interesante, analizar los niveles de las proteínas CARP, otra familia de proteínas reguladoras de la caspasa 8.

Después se analizaron los niveles proteicos mitocondriales de dos miembros de la familia de Bcl-2. La proteína Bid pertenece a la familia de Bcl-2, es una molécula

de conexión entre la vía extrínseca e intrínseca, ya que puede ser cortada por la caspasa 8 y migrar a mitocondria en la cual desencadena la liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales, como Smac o citocromo C; y así inicia la activación de la vía intrínseca con la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9. En nuestro sistema, se aprecia que se da un corte de Bid en las etapas tardías de la apoptosis en células HeLa Bcl-3-, lo cual indica que en estas etapas refuerzan la vía intrínseca por el corte de Bid y su subsiguiente migración a la mitocondria. Y la activación de caspasa 9, en tiempos más tempranos en células HeLa Bcl-3- se debe a un efecto directo de la vía intrínseca, posiblemente de una señal que se origine del núcleo o estrés celular provocado por la radiación UVB (Figura 8).

En cuanto a la proteína Bcl-2, se encontró una disminución de sus niveles a las 12 y 24 hrs posradiación en células HeLa Wt, acorde con lo reportado en algunos sistemas apoptóticos, donde esta proteína anti-apoptótica es cortada por la caspasa 3 [63, 64]. En las células HeLa Wt, se encontró una disminución en los niveles de Bcl-2 con respecto a los niveles basales, de forma interesante estos niveles basales se encuentran aumentados en las células HeLa Bcl-3-, por lo tanto, se puede sugerir que posiblemente el gen o la captura mitocondrial esta regulado directa o indirectamente por Bcl3. Este mismo efecto lo encontramos en la proteína Smac (Figura 9).

Recapitulando, estos resultados sugieren que la sensibilidad de las células HeLa Bcl-3- a la radiación UVB se correlaciona con una activación más temprana de las caspasas iniciadoras de las vías extrínsecas e intrínseca; si bien, esta activación

no se debe a miembros de la familia de Bcl-2 o de FLIP, ya que aunque se encontraron resultados interesantes meritorios de ser analizados después con más detalle; estos cambios se presentaron en etapas tardías de la apoptosis, lo cual apunta a ser más una consecuencia que una causa.

En base en los resultados anteriores, el análisis se dirigió ahora lo dirigimos a otro blanco dentro de la célula que origina la apoptosis después de la radiación UVB, el núcleo. Existen reportes que demuestran que la radiación UVB activa principalmente el sistema de reparación NER aunque también intervienen proteínas de otros sistemas como el reparo de mismatch (MMR) [65].

La proteína p53 tiene un papel importante en la detección del daño al DNA causado por la radiación UVB. La sensibilidad a sufrir apoptosis por UVB en fibroblastos y queratinocitos ha sido asociada a los niveles de p53 [41,42]. Durante radiación UVB, se ha detectado un aumento de la proteína de p53 en varios sistemas y se ha observado que los queratinocitos, los cuales son más sensibles a UVB tienen menos aumento de p53 [42]. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro sistema.

Los niveles de p53 nucleares en condiciones basales fueron bajos como se esperaba, ya que las células HeLa tienen HPV que causa la degradación de p53 por la producción de la proteína E6. Durante la apoptosis inducida por UVB, se observa una disminución a niveles no detectables de p53 con un aumento a las 24 horas por radiación en las células HeLa Wt, mientras que en células HeLa Bcl-3- los niveles nucleares bajan y solo hay un aumento en los tiempos tardíos (Figura 10). Las células HeLa Bcl-3- que son más susceptibles a UVB tuvieron menos

niveles de p53. Posiblemente esta disminución en los niveles de p53 provocan una falta de respuesta en los sistemas de reparación y, por lo tanto, la célula muera más rápidamente.

Cuando se analizaron tres proteínas que regulan p53 en respuesta al daño, encontramos que sus niveles eran notoriamente menores en las células HeLa Bcl-3-, tanto Yin Yang [65-68], Ref-1 [69,70], y sobretodo DNA-PK [71-74] tuvieron menores niveles a nivel basal lo cual explica los niveles bajos de p53 (Figura 11,12 y 13).

Así al parecer la capacidad de Bcl-3 para conferir resistencia a la radiación UVB se debe principalmente a su papel en la reparación al DNA. En el 2003, Watanabe y colaboradores [28], revelaron con un ensayo de dos híbridos que Bcl-3 se une a la proteína p300-CBP (Histona acetiltransferasa) y a la proteína B3BP la cual tiene actividad de cinasa polinucleótido y de endonucleasa, formando un complejo que interviene en sistemas de reparación.

El reciente repote de Kashatus y colaboradores [27], apoya los resultados que se obtuvieron, ya que este grupo de investigación encontró que al aumentar los niveles de Bcl-3 confiere resistencia contra radiación UV aunque emplearon radiación UVC, junto con los hallazgos obtenidos en este trabajo, se puede concluir que realmente Bcl-3 tienen un papel muy importante en el mecanismo apoptótico desencadenado por UV.

El mecanismo propuesto por Kashatus [27], es en parte contradictorio a lo que apuntan los resultados obtenidos en este trabajo. Este grupo encontró que al

disminuir los niveles de Bcl-3 aumentan los niveles de p53, aunque fueron medidos en extractos totales. En nuestro sistema, se encontró que la disminución de Bcl-3 baja los niveles de p53 nuclear, es necesario que en nuestro modelo se determinó los niveles citosólicos de p53, para poder aclarar esta discrepancia. Además, medir los niveles de p53 en células MCF-7 como este grupo lo realizó, y así determinar si el efecto de Bcl-3 sobre p53 depende de la línea celular. Igualmente, determinar si los cambios que nosotros proponemos importantes en la modulación sensibilidad a apoptosis por Bcl-3 vía DNA-PK, Yin Yang y Ref-1, se presenta en las células MCF-7.

Finalmente, otro dato importante e interesante es destacar que en las etapas finales de la apoptosis, a las 12 y 24 horas en células HeLa Bcl-3- se expresa otra isoforma de survivina a nivel nuclear durante la apoptosis (Figura 14). A la proteína survivina se le ha dado un papel importante en la mitosis [75], además de su papel originalmente descrito de proteína inhibidora de apoptosis [76], asimismo se sabe que tiene un papel en la apoptosis inducida por UVB [55,77]. Será en futuros trabajos que se determinará si la isoforma de la proteína survivina observada esta relacionado con la multinucleación observada en las células HeLa Bcl-3-.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que la proteína reguladora del factor nuclear Kappa B, Bcl-3, tiene un papel importante la regulación de la apoptosis inducida por UVB.

Las células HeLa con menos niveles de Bcl-3 por medio de RNAi, fueron más susceptibles a apoptosis por UVB, y presentan una activación más rápida de las caspasas iniciadoras de las dos principales vías apoptóticas.

Los resultados apuntan a que Bcl-3 modula diferentes puntos de las vías, aumentando la proteína Bid cortada, y la isoforma de FLIPs tiene cambios en etapas tardías lo que parece deberse a una consecuencia más y la causa de mayor sensibilidad a apoptosis.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis del origen de la modulación de apoptosis por UVB por Bcl-3, que se debe a modulación de proteínas de detección y de reparación del daño al DNA, lo cual se asocia con una disminución en los niveles nucleares de la proteína p53. Las proteínas desreguladas por Bcl-3 fueron Yin Yang, DNAPK, Ref-1 y Survivina.

IX. PERSPECTIVAS

Analizar la activación de las dos caspasas en intervalos de tiempo mas pequeños, y durante en este lapso determinar que vía se activa primero, así mismo analizar la activación de las proteínas CARP.

Determinar si la isoforma de la proteína survivina observada esta relacionado con la multinucleación observada en las células HeLa Bcl-3-.

Es de suma importancia determinar que los niveles de Bcl-3 están regulando los niveles de estas proteínas así como saber si este fenómeno se presenta en queratinocitos o células de melanoma, aspectos que actualmente se están abordando en nuestro grupo de investigación.

X. ANEXO

Proteína	Función	Acción	Alteraciones	Referencias
p53	Supresor de tumor	Apoptosis, reparación de DNA, arresto del ciclo celular (ciclina p21, Noxa y Puma y su inhibidor Hdm2).	Crecimiento disregulado, protección contra apoptosis, e inestabilidad genómica, acumulación de mutaciones secundarias.	78,79,80,81
Yin-Yang 1	Activar o reprimir la transcripción (p53).	Embriogenesis, diferenciación, replicación y ciclo celular.	Proliferación celular no revisada, resistencia a apoptosis, iniciador de tumorigenesis y potencial metastático.	66,67,68
DNA-PK	Respuesta al daño de DNA Sistema de reparación NHEJ (Unión de extremos no-homólogos).	Apoptosis en respuesta al daño al DNA (Activación de p53, Mdm2)	Defectos en reparación de DNA y apoptosis	71,72,73
Ref-1	Endonucleasa AP en VER (Reparación por excisión de bases).	Papel clave en BER, regulador clave de p53 y, del arresto del ciclo celular y apoptosis.	Defectos en el arresto del ciclo celular, aumento de BER, crecimiento celular y progresión del cáncer	65, 69,70

Survivina	IAP	Papel anti-apoptótico (se une a Caspasa -3 y -7), regulador del huso mitótico, puede inducir apoptosis (AIF)	Suprime la apoptosis, progresión del ciclo celular. Sobrexpresada en la mayoría de los cánceres humanos.	75,76,77
Bid	Miembro de la familia Bcl-2. Papel pro-apoptótico y enlace entre ambas vías de apoptosis	Apoptosis, es activado por la caspasa -8 y promueve la liberación del Citocromo C. Activado por la caspasa -3.	Aumento de apoptosis	64,82
Bcl-2	Miembro de la familia Bcl-2. Anti-apoptótica	Integrada a la membrana mitocondrial; inhibe la apoptosis, previniendo la liberación del citocromo C	Promueve la tumorigenesis.	63,64,83.
FLIP	Inhibe la activación de la caspasa -8 y la vía extrínseca	Estructura homóloga a la caspasa -8; bloquea su sitio de unión y activación (DISC).	Suprime la vía extrínseca de la apoptosis	61,62.

ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén diaminotetra acético
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodanton
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mJ/cm ²	MiliJoules por centímetro cuadrado
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros cuadrados
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl ₂	Cloruro de sodio
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NP40	Nonident-40
°C	Grados centígrados
pb	Pares de base
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenylmetilsulfonilfluorida
PVDF	Membrana de polivinilidenodifluoruro
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reversa transcriptasa y reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de electroforesis con duodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador tris, borato salino
Tris	Hidroximetil aminometano
TBS/Tween	Amortiguador tris borato salino/Tween
µg/ml	Microgramos por mililitro
µl	Microlitos

XI. LITERATURA CITADA

1. Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A. 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications tissue kinetics. *Britanic Journal Cancer*. 26: 239-257.
2. Duckett, C., Nava, V., Gedrich, R., Clem, R., Van Donger, J., Gilfillan, M., Shiels, H., Hardwick, J. y Thompson, C. 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO Journal* 15: 2685-2694.
3. Ponder, B. 2001. Cancer Genetics. *Nature*. 411: 336-341.
4. Goulet, D., Courvalin, J. y Buendia, B. 1998. A chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *Journal Cell Science*. 111: 1441-1451.
5. Kerr, J. F. R., and Harmon, B. V. 1991. Primera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.p. 5-13.
6. Kroemer G., Dallaporta, B. y Resche, M. 1998. The mitochondrial death/live regulador in apoptosis and necrosis. *Annual Review Physiology*. 60: 619-642.
7. Kothakota, S. 1997. Caspase-3 generated fragment of gesolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278: 294-298.
8. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. Debatin, K., Krammer, P. y Peter, M. 1998. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal*. 17: 1675-1687.
9. Deveraux, Q. y Reed. J. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & Development*. 13:239-252.
10. Schmitz, M., Mattioli, I., Buss, H. y Kracht, M. 2004. NF-kappaB: a multifaceteted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. 5: 1348-1358.
11. Yamamoto, Y. y Gaynor, R. 2001. Therapeutic potencial of inhibition of the NF-kB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal Clinical Investigation*. 107: 135-142.
12. Chen, L. y Greene, W. 2004. Shaping the nuclear action of NF- kB. *Nature Reviews*. 5: 392-401.
13. Hayden, M. y Ghosh, S. 2004. Signaling to NF-kB. *Genes and Development*. 18: 2195-2224.
14. Yamamoto, Y. y Gaynor, R. 2004. Ikb kinases: key regulators of the NF-kB. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 29 (2): 72-80.
15. Grossman, M., O'Reilly, L. y Gugasyan, R. 2000. The anti-apoptotic activies of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO Journal*. 19:6351-6360.
16. Orange, J. y Geha, R. 2003. Finding NEMO: genetics disorders of NF-kB activation. *Journal Clinical Inv*. 112: 983-985.
17. Bates, P. y Shigeki, M. 2004. Expanded nuclear roles for IkbBs. *Science's STKE*. Pe48. 254-256.
18. Ghost, S. y Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF-kB puzzle. *Cell*. 109: S81-S96
19. Silverman, N. y Maniatis, T. 2001. NF-kB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Development*. 15: 2321-2342.

20. Ohno, H., Takimoto, G y McKeithan, T. 1990. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*. 60(6): 991-997.
21. McKeithan, T., Takimoto, G., Ohno H., Blorling, V., Morgan, R., Hecht, B., Dube, I., Sandberg, A. y Rowley, J. 1997. BCL-3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer*. 20(1):64-72.
22. Zhang, G., Didonato, J., Karin, M. and McKeithan, T. 1994. Bcl3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF- κ B proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 14(6):3915-3926.
23. Lee do H., Cho K., Park S., Kim E. Y Joo C. 2005. Cellular death mediated by nuclear factor kappa B (NF-kappaB) translocation in cultured human lens epithelial cells after ultraviolet-B irradiation. *J Cataract Refract Surg*. 31(3):614-619.
24. Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F. Scheidereit, C. y Leutz, A. 1999. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene*. 18:3316-3323.
25. Rocha. S., Martin, A., Meek, D. y Perkins, D. 2003. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF- κ B subunit with histone deacetylase 1. *Molecular and Cellular Biology*. 23(13):4713-4727.
26. Na, S., Choi, J., Kim, H., Jhuns, B., Lee, Y. y Lee, J. 1999. Bcl-3 an I κ B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *The journal of Biological Chemistry*. 274(40): 28491-28496.
27. Kashatus, D., Cogswell, P. y Baldwin, A. 2006. Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes & Development*. 20 (2) :225-235.
28. Watanabe, N., Wachi, S. y Fujita, T. 2003. Identification and characterization of BCL-3-binding protein: implications for transcription and DNA repair or recombination. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(28):26102-26110.
29. Boulton, S., Gartner, A., Reboul, J., Vaglio, p., Dyson, N., Hill, D. y Vidal, M. Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. *Science*. 295. 127-131.
30. Young, N., Eun, C., Jong, K., Hak J., Chul L. and Woon. Lee. 1999. Bcl3, an I κ B Protein, Stimulates Activating Protein-1 Transactivation and Cellular Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (40): 28491–28496.
31. Ulm, R. y Nagy, F. 2005. Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinio in Plant Biology*. 8:477-482.
32. Beissert, S. y Schwartz, T. 1999. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Journal Dermatology Symp Proc*. 4:61-64.
33. Fisher, G., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. y Voorhees, J. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatology*. 138: 1462-1470.
34. De Gruijl, F., Van Kranen, H. y Mullenders, L. 2001. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenis pathways in skin cancer. *Journal Photochemical Photobiology B*. 63: 19-27.
35. Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. y Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 189: 21-39.
36. Pfeifer, G. 1997. Formation and processing of UV photoproducts: Effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry Photobiology*. 65:270-283.
37. Pfeiter, G. 1997. Formation and processing de UV photoproducts: Effects of DNA sequence and cromatin environment. *Photochem Photobiology*. 65:270-283.

38. Lo HL, Nakajima S, Ma L, Walter B, Yasui A, Ethell DW, et al. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* 2005;5:135.
39. Peters, A., Young, L., Maeda, T., Tron, V. y Andrew, S. 2003. Mammalian DNA mismatch repair protects cells from UVB-induced DNA damage by facilitating apoptosis and p53 activation.
40. Lesser MP, Turtle SL, Farrell JH, Walker CW. Exposure to ultraviolet radiation (290-400 nm) causes oxidative stress, DNA damage, and expression of p53/p73 in laboratory experiments on embryos of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Physiol Biochem Zool* 2001;74(5):733-41.
41. Latonen L, Taya Y, Laiho M. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* 2001;20(46):6784-93.
42. Papoutsaki M, Moretti F, Lanza M, Marinari B, Sartorelli V, Guerrini L. 2005. A p38-dependent pathway regulates DeltaNp63 DNA binding to p53-dependent promoters in UV-induced apoptosis of keratinocytes. *Oncogene*.24(46):6970-5.
43. Bode, A. y Dong, Z. 2003. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Science STKE* 167. RE2
44. Tornaletti, S. y Pfeifer, G. 1996. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays*. 8:221-228.
45. Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. y Schwarz, T. 1998. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *Journal Cell Biology*. 140: 171-182.
46. Bang B, Gniadecki R, Larsen JK, Baadsgaard O, Skov L. 2003. In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp Dermatol*. 12(6):791-8.
47. Bang B, Rygaard J, Baadsgaard O, Skov L. 2002. Increased expression of Fas on human epidermal cells after in vivo exposure to single-dose ultraviolet (UV) B or long-wave UVA radiation. *Br J Dermatol*. 147(6):1199-206.
48. Sheikh, M., Antinore, M., Huang, Y. y Fornace, A. 1998. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene*. 17: 2555-2563.
49. Maeda T, Hao C, Tron VA. 2001. Ultraviolet light (UV) regulation of the TNF family decoy receptors DcR2 and DcR3 in human keratinocytes. *J Cutan Med Surg*. 5(4):294-8.
50. Sitailo, L., Tibudan, S. y Denning, M. 2002. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *Journal Biology Chemical*. 277: 19346-19352.
51. Kulms, D. y Schwarz, T. 2002. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 64:837-841.
52. Van Laethem A, Van Kelst S, Lippens S, Declercq W, Vandenabeele P, Janssens S. 2004. Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *Faseb Journal*.18 (15):1946-8.
53. Zhang W., Hanks A., Boucher K, Florell S., Allen S., Alexander A. 2005. UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development. *Carcinogenesis*. 26(1):249-57.
54. Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. 2005. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(8):1547-53.

55. Zhang H. 2005. Survivin protein in UVB induced apoptosis of melanoma cells and in melanoma progression. *Oncol Rep.* 13(6):1121-6.
56. Banerjee G, Gupta N, Kapoor A, Raman G. 2005. UV induced bystander signaling leading to apoptosis. *Cancer Letters.* 223(2):275-84.
57. Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S. 2005. Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis.* 10(5):1121-30.
58. Thyss R, Virolle V, Imbert V, Peyron JF, Aberdam D, Virolle T. 2005. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *Embo J.* 24(1):128-37.
59. Poppelmann B, Klimmek K, Strozyk E, Voss R, Schwarz T, Kulms D. 2005. NF{kappa}B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 280(16):15635-43.
60. Kucharczak, J., Simmons, M., Fan, Y. y Gélinas, C. 2003. To be, or not to be: NF-κB in the answer – role of Rel/NF-κB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 22:8961-8982.
61. Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. y Kirchhoff, S. 2001. FLICE-Inhibitory proteins: Regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Molecular and cellular Biology.* 21 (24): 8247-8254.
62. Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S., Krammer, P. y Kirchhoff, S. 2004. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *The Journal of Immunology.* 172: 2194-2200.
63. Puthalakath, H.y Strasser, A. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and posttranslational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9:505–512.
64. Cory, S. y Adams, J. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Natural Review Cancer.* 2:647–656.
65. Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. y Garewal, H. 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research.* 511: 145-178.
66. Yakovleva, T., Kolesnikova, L., Vukojevic. V., Gileva, I., Tan-No, K., austen, M., Lüscher, B., Ekström, T., Terenius, L. y Bakalkin, G. 2004. YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription. *Biochem and Biophys Res Comm.* 318: 615-624.
67. Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. y Bonavida, B. 2006. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* 25: 1125-1142.
68. Sui, G., Affar, E., Shi, Y., Brignone, C., y col. Shi, Y. 2004. Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell.* 117:859-872.
69. Evans, A., Limp-Foster, M., y Kelley, R. 2000. Going APE over ref-1. *Mutant Research.* 461:83-108.
70. Gaiddon, C., Moorthy, C. y Prives, C. 1999. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO Journal.* 18: 5609–5621.
71. Smith, G. y Jackson, S. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes and Development.* 13: 916-934.
72. Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., Singh, R. y Agarwal, R.2005. Silibin up-regulates DNA-Protein Kinase-dependent p53 activation to enhance UVB-induced apoptosis in mouse epithelial JB6 cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 280 (21): 20375-20383.

73. Achantha, G. Pelicano, H., Feng, L., Plunkett, W. y Huang, P. 2001. Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Research*. 61 8723–8729.
74. Itoh, T. y Horio, T. 2001. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is cleaved during UV-induced apoptosis. *Journal Dermatology Sci*. 25 72–77.
75. Altieri, D. 2003. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 22: 8581-8589.
76. Shin, S., Sung, B., Cho, Y., Kim, H., Ha, N., Hwang, C., Chung, Y. y Jung, B. 2001. Oh, An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*. 40: 1117-1123.
77. Liu, T., Brouha, B. y Grossman, D. 2004. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*. 23: 39-48.
78. Levine, A., Finlay, C. y Hinds, P. 2004. p53 is a tumor suppressor gene. *Cell*. S113: S67-S69.
79. Vousden, K. y Prives, C. 2005. p53 and prognosis: New insights and further complexity. *Cell*. 120: 7-10.
80. Chipuk, J., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N., Newmeyer, D., Schuler, M. y Green, D. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 303: 1010-1014.
81. Bond, G., Hu, W. y Levine, A. 2005. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Current Cancer Drug Targets*. 5: 3-8.
82. Hengartner, M. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
83. Danial, N. y Kornsmeyer, S. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell*. 116: 205-219.
84. Kolek, O., Gajkowska, B., Marek, M. y Motyl, Tomasz. 2003. Co-localization of apoptosis-regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF- β 1. *European Journal of Cell Biology*. 82: 303-312.